UNTERSUCHUNGEN ZUR FRÜHEN EMBRYONALENTWICKLUNG DER MAUS MIT HILFE VON ANTIKÖRPERN

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt
von

KLAUS BOLLER
aus Darmstadt

1984

UNTERSUCHUNGEN ZUR FRÜHEN EMBRYONALENTWICKLUNG DER MAUS MIT HILFE VON ANTIKÖRPERN

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt
von

KLAUS BOLLER
aus Darmstadt

1984

Tag der mündlichen Prüfung: 29.11.1984

Dekan:	Prof. Dr. H. U. Seitz
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. P. Hausen
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. D. Ammermann

Die vorliegende Arbeit wurde vom Herbst 1981 bis Herbst 1984 im Friedrich-Miescher-Laboratorium der Max-Planck-Gesellschaft in Tübingen unter Anleitung von Herrn Dr. R. Kemler durchgeführt.

Ich danke Herrn Dr. R. Kemler für das Thema und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes. Ihm sowie allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe gilt mein Dank für Unterstützung, Kritik und fruchtbare Diskussionen im Verlaufe der Arbeit. Besonders erwähnt sei die Hilfe von Frau C. Baradoy bei den Zellkulturarbeiten, von Frau M. Katz bei den embryologischen und und Herrn W. Schmidt bei den biochemischen Arbeiten.

Herrn D. Vestweber danke ich für die Überlassung des anti-Uvomorulin-Antiserums und die vielen anregenden Diskussionen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. H. Frank und allen seinen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern im EM-Labor und der Dunkelkammer des Max-Planck-Instituts für Entwicklungsbiologie für die gute Zusammenarbeit. Frau R. Braun besorgte die Einbettungen, Frau I. Zimmermann die Herstellung der Ultradünnschnitte und Herr J. Sauter die technische Betreuung der Geräte. Bei Frau R. Grömke-Lutz und Frau S. Haase bedanke ich mich für die hervorragende Ausführung der Fotoarbeiten und bei Frau G. Weinraub für die Anfertigung der Zeichnungen.

Herrn Dr. H. Schwarz danke ich für seine Unterstützung und für die vielen hilfreichen Gespräche in sämtlichen Phasen der

Arbeit.

Bei Herrn Dr. B.A. Imhof bedanke ich mich für die Einführung in die Techniken der Mikroinjektion und der Herstellung ultradünner Gefrierschnitte.

Mein Dank gilt schließlich auch meinem Freunde A.T. Kaiser, der sich der Mühe unterzog als Nichtfachmann die Niederschrift dieser Arbeit kritisch durchzuarbeiten und zu helfen, sie in einem lesbaren Deutsch zu verfassen.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG.....1

1.1. Die frühe Embryonalentwicklung der Maus.....2

1.2. Das Teratokarzinomsystem.....5

1.3. Antikörper als Hilfsmittel zur Untersuchung von Differenzierungsvorgängen.....8

1.4. Ziel dieser Arbeit.....13

2. MATERIAL UND METHODEN.....14

2.1. Material.....14

2.1.1. Zellinien.....14

2.1.2. Antikörper.....14

2.1.3. Medien und Puffer.....15

2.1.4. Plastikmaterial für die Zellkultur.....16

2.1.5. Chemikalien.....16

2.1.6. Geräte.....17

2.2. Methoden.....18

2.2.1. Versuchstiere und Embryonen.....18

2.2.2. Zellkultur.....18

2.2.3. Antikörperreinigung.....19

2.2.4. Indirekte Immunfluoreszenz.....20

2.2.5. Mikroinjektion.....22

2.2.6. Elektronenmikroskopie.....24

2.2.6.1. Eponeinbettung.....24

2.2.6.2. Ultradünnschnitte.....25

2.2.6.3. Lowicryl-Einbettung.....26

2.2.6.4. Ultradünne Gefrierschnitte.....28

2.2.6.5. Herstellung und Koppelung von kolloidalem Gold.....31
2.2.6.6. Immunmarkierungen.....35

3. ERGEBNISSE.....38
3.1. Monoklonale Antikörper als Marker für Differenzierung in-vitro und in-vivo.....38
3.1.1. Immunfluoreszenz an Postimplantations-Embryonen.....38
3.1.2. In-vitro-Differenzierung von attachierten F9-Zellen.....41
3.1.3. Differenzierung von in Suspension wachsenden F9-Aggregaten.....47
3.2. Mikroinjektion von Antikörpern gegen Zytokeratin.....50
3.3. Subzelluläre Lokalisation von Uvomorulin.....65
3.3.1. Immunfluoreszenz von Uvomorulin an Kulturzellen.....65
3.3.2. Immunfluoreszenz von Uvomorulin am Dünndarm.....69
3.3.3. Elektronenmikroskopische Lokalisation von Uvomorulin.....72

4. DISKUSSION.....78
4.1. Intermediärfilamente.....79
4.2. Uvomorulin.....84

5. ZUSAMMENFASSUNG.....89
6. ABKÜRZUNGEN.....91
7. LITERATURVERZEICHNIS.....92

1. EINLEITUNG

Das biologisch am besten untersuchte Säugetier ist die Maus. Ihre leichte Haltung, die relativ kurze Reproduktionszeit und die Verfügbarkeit gut definierter Laborstämme sind günstige Vorbedingungen, die sie zu einem geeigneten Objekt der Forschung machen. Seit etwa dreißig Jahren wird die Maus auch für Fragen der experimentellen Entwicklungsbiologie herangezogen, dabei hat sich die Einführung eines In-vitro-Modells für die Differenzierung, des Teratokarzinomsystems, als besonders fruchtbar erwiesen. Die konsequente Fortführung von an der Maus gewonnenen Erkenntnissen und ihre Anwendung auf den Menschen hat in den letzten Jahren einerseits zu der nicht unumstrittenen Entwicklung von In-vitro-Befruchtung und "Retortenbabys" geführt, andererseits eine Reihe wichtiger Erkenntnisse für die Tumorforschung gebracht.

Da die vorliegende Arbeit sich mit Aspekten der frühen Maus-Embryonalentwicklung befaßt, soll im folgenden zunächst der Ablauf des früh-embryonalen Geschehens geschildert werden. Daran anschließend werden Teratokarzinome als experimentelles Modell für Differenzierungsvorgänge beschrieben, und im dritten Abschnitt der Einleitung werden kurz die wichtigsten Versuche dargestellt, mit Hilfe von Antiseren und monoklonalen Antikörpern Differenzierung und Entwicklung der Maus zu studieren.

1.1. Die frühe Embryonalentwicklung der Maus

Die Embryonalentwicklung der Maus beträgt durchschnittlich 19 Tage. Die Befruchtung des etwa 90 µm großen Eies erfolgt in der Ampulle des Eileiters, und in den 4 folgenden Tagen bis zur Einnistung im Uterus wandert der Embryo den Eileiter hinab. Während dieser Wanderung finden die ersten Teilungen des Embryos statt, der noch von der Zona pellucida, einer nicht-zellulären Glykoprotein-haltigen Hülle, umgeben ist. Zum ersten Mal teilt sich die Eizelle etwa 24 Stunden nach der Befruchtung und im folgenden etwa alle 12 Stunden. Am dritten Tag, im 8-Zell-Stadium, ändert der Embryo seine Gestalt von einem losen, traubenartigen Zellhaufen zu einer kompakten Kugel, der Morula, in der die Zellgrenzen kaum mehr sichtbar sind (s. Abb. 1). In diesem Stadium erreicht er den oberen Uterus. Einen Tag später, wenn der Embryo etwa 32 Zellen hat, beginnt im Innern die Bildung einer Höhle, des Blastozoels. Der Embryo heißt nun Blastozyst. Diese Höhle nimmt an Größe zu und ist nur von einer Schicht epithelartiger Zellen umgeben, dem Trophektoderm. Lediglich an einer Seite des Blastozoels befindet sich eine Gruppe von Zellen, die Innere Zellmasse (ICM). Das Auftreten dieser beiden Zelltypen, Trophektoderm und ICM-Zellen, ist der erste sichtbare Differenzierungsschritt in der Embryonalentwicklung der Maus.

Die Kompaktion ist das zentrale Ereignis der frühen Entwicklung, sie bedeutet den ersten morphogenetischen Vorgang und schafft die Voraussetzung für den ersten Differenzierungsschritt. Durch die Kompaktion entstehen im Embryo innere Zellen, die von äußeren vollständig umhüllt

werden. Nach der "Inside-outside-Hypothese" (Tarkowsky und Wroblewska, 1967) werden aufgrund ihrer Position die inneren Zellen der Morula zu ICM- und die äußeren zu Trophektoderm-Zellen. Nach einer anderen Theorie (Johnson, 1981; Pratt et al., 1982), ist es die Polarisation der Zellen im 8-Zellstadium, die den Tochterzellen nach der nächsten Teilung eine unterschiedliche Ausstattung mitgibt und sie dadurch determiniert.

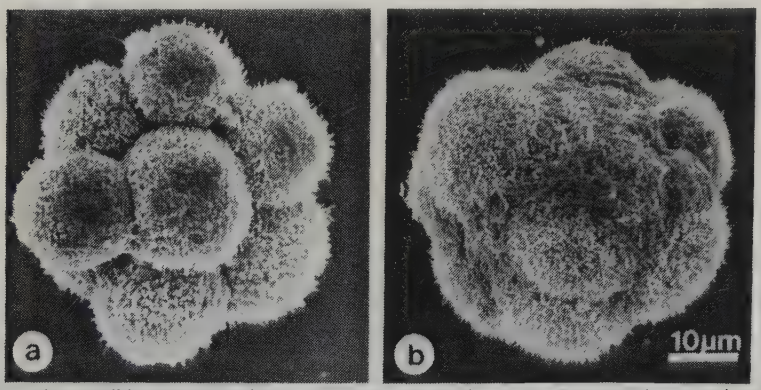

Abb. 1: Präimplantationsembryo etwa im 8-Zellstadium; a) vor der Kompaktion, b) nach fast vollendeter Kompaktion. Die zunächst kugelrunden Zellen flachen sich im Verlaufe der Kompaktion gegeneinander ab, die Zellgrenzen werden kaum mehr erkennbar.

Eine Reihe von morphologischen Veränderungen der Zellen geht mit der Kompaktion einher. Sie bestehen in der Polarisation, dem Abflachen der zuvor runden Zellen gegeneinander und der Ausbildung bestimmter Zelladhäsionsstrukturen (Tight Junctions, Gap Junctions) (Ducibella et al., 1975). Eine Reihe von Reagenzien, die das Zytoskelett der Zelle oder die Zytoplasmamembran angreifen, beeinflußt diese Vorgänge (Pratt, 1982). Man nimmt daher an, daß sowohl Oberflächenstrukturen als auch das Zytoskelett eine

entscheidende Rolle bei den Vorgängen der Determinierung und Differenzierung spielen, wenn auch die Einzelheiten noch weitgehend ungeklärt sind.

Am vierten Tag der Entwicklung, der Blastozyst hat nun 64 oder mehr Zellen und ein ausgeprägtes Blastozoel, schlüpft der Embryo aus der Zona pellucida und beginnt mit seiner Einnistung, der Implantation, im Uterus. Dabei heftet er sich zunächst an die Uteruswand und durchdringt die Schleimhaut, während das mütterliche Gewebe selbst proliferiert und den Embryo umschließt. Erst jetzt beginnt der Embryo, ernährt durch das Uterusgewebe, an Größe zuzunehmen.

Aus der Inneren Zellmasse ist inzwischen primitives Ektoderm und primitives Entoderm entstanden. Der Embryo wächst und bildet den sogenannten Eizylinder, der aus einem embryonalen Teil - er bildet später den eigentlichen Embryo - und einem extraembryonalen Teil besteht, aus dem später die Eihäute entstehen. Der "ektoplazentale Konus" schließlich bildet den Übergang vom Ektoderm zum Trophektoderm und dem mütterlichen Gewebe. Das Entoderm proliferiert und kleidet bald die gesamte Blastozystenhöhle aus, die nun Dottersack genannt wird. Man unterscheidet das viscerale Entoderm, es bedeckt den Embryo als einschichtiges Epithel, und das parietale Entoderm, dieses liegt den Trophektodermzellen auf und sekretiert eine dicke Basalmembran, die sogenannte Reichert´sche Membran.

Nun bildet sich im Innern des Embryos im Ektoderm die Proamnionhöhle, und zwischen Entoderm und Ektoderm wandern -

ausgehend vom Primitivstreifen, einem begrenzten Gebiet im embryonalen Ektoderm, - Mesenchymzellen ein. Damit sind die drei Keimschichten des Embryos entstanden. Mit der Bildung der drei Keimblätter und der Vollendung der Implantation am Tag 6 ist die erste Phase der Embryonalentwicklung abgeschlossen. Den Ablauf der frühen Embryonalentwicklung der Maus skizziert Abb. 2.

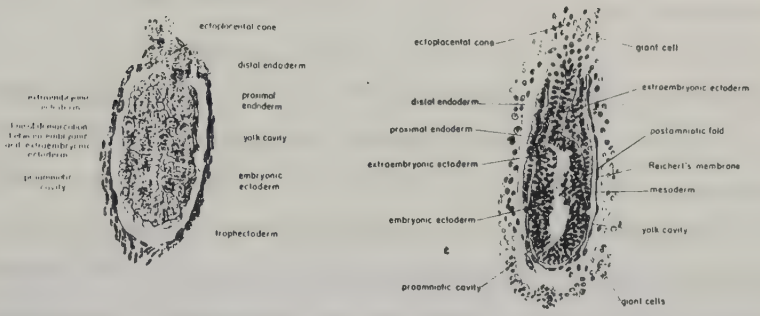

Abb. 2: Schnitt durch einen 6 Tage alten (links) und einen 6,5 Tage alten Mausembryo (rechts). Aus Rugh, R.: The mouse. Its reproduction and development. Burgess Publ. Co. Minneapolis/Minn. 1968.

In der nächsten Entwicklungsphase bis etwa zum Tag 13 werden die Organanlagen sämtlicher Organe gebildet, und nach und nach bildet sich die endgültige Gestalt heraus. Im dritten Entwicklungsabschnitt, vom 13 bis zum 19 Tag, beginnen schließlich die Organe und Gewebe allmählich ihre spätere Funktion wahrzunehmen.

1.2. Das Teratokarzinomsystem

Ein großer Nachteil von Maus-Embryonen für die experimentelle Embryologie ist ihre geringe Größe und die begrenzte Menge des Materials. Eine erhebliche Erleichterung brachte daher

die Einführung des Teratokarzinom-Systems für entwicklungsbiologische Fragestellungen. Teratokarzinome bei Mäusen wurden erstmals 1954 beschrieben (Stevens und Little, 1954). Sie sind maligne Tumore, die aus einer Vielzahl unterschiedlich differenzierter Gewebe aller drei Keimblätter bestehen. Daneben enthalten sie undifferenzierte Stammzellen, sogenannte EC-Zellen (embryonale Karzinomzellen), aus denen sich die differenzierten Abkömmlinge bilden und die für das unbegrenzte Wachstum des Tumors verantwortlich sind.

Im Mausstamm 129 entstehen zu einem hohen Prozentsatz in den Hoden spontan Teratokarzinome, sie sind Derivate der männlichen Urkeimzellen (Stevens, 1967). Ovarielle Teratokarzinome wurden im Mausstamm LT beobachtet, sie stammen von Eiern, die sich parthenogenetisch zu entwickeln begannen (Stevens und Varnum, 1974). In anderen Mausstämmen können Teratokarzinome experimentell dadurch erzeugt werden, daß man 3-6 Tage alte Embryonen in die Hoden von Tieren desselben Stammes transplantiert (Stevens, 1970). Teratokarzinome können in-vivo durch fortgesetzte Transplantation unter die Haut oder in die Bauchhöhle fortgepflanzt werden. Im ersten Falle differenziert ein großer Anteil der EC-Zellen, in der Ascitesflüssigkeit der Bauchhöhle dagegen bilden sich sogenannte "embryoid bodies", in denen eine Kugel aus undifferenzierten EC-Zellen nur von einer Schicht Entoderm-Zellen umgeben ist. Diese embryoid bodies erinnern in ihrem Aufbau stark an den frühen Embryo. Die meisten Teratokarzinome lassen sich in Zellkultur als EC-Zellinien halten, die sich bei geeigneten Kulturbedingungen nicht verändern.

Vieles belegt die starke Ähnlichkeit zwischen den pluripotenten Zellen des frühen Embryos und den differenzierungsfähigen EC-Zellen der Teratokarzinome. Einerseits entstehen Teratokarzinome direkt aus embryonalen Zellen, andererseits können EC-Zellen, die in einen Blastozysten injiziert wurden, an der Entwicklung der Maus teilnehmen, wobei aus Abkömmlingen der EC-Zelle normale Gewebe entstehen können (Brinster, 1974; Mintz und Illmensee, 1975). Diese Analogie zwischen EC-Zellen und embryonalen Zellen wurde durch morphologische (Pierce und Beals, 1964), biochemische (Bernstine et al., 1973) und serologische (Artzt et al., 1973) Analysen bestätigt. Mitunter allerdings können sich Teratokarzinomzellen nach längerer Zeit in Kultur verändern und EC-Zellen in ihrem Differenzierungspotential eingeschränkt werden. So ist es zu erklären, daß manche embryonalen Karzinomzellen nur noch zu bestimmten Geweben differenzieren (Damjanov und Solter, 1974) oder gar "nullipotent" werden. Neuerdings ist es möglich, embryonale Zellen der Inneren Zellmasse auch direkt, ohne den Umweg über einen Tumor, in Kultur zu nehmen (Evans und Kaufman, 1981; Martin, 1981; Doetschman et al., eingereicht). Diese sogenannten ES-Zellinien (für embryonale Stammzellen) zeigen bei größerer Nähe zum Embryo prinzipiell die gleichen Eigenschaften (Tumorbildung, Differenzierungsfähigkeit, Teilnahme an der normalen Entwicklung) wie EC-Zellen. Die Analogie von EC-Zellen und embryonalen Karzinomzellen kann also als gut bestätigt gelten, Teratokarzinome in-vivo wie in-vitro sind somit ein geeignetes Modell zum Studium embryonaler Zelldifferenzierungsvorgänge.

1.3. Antikörper als Hilfsmittel zur Untersuchung von Differenzierungsvorgängen

Explantiert man frühe Maus-Embryonen aus dem Uterus syngen, d.h. im gleichen Mausstamm, an andere Stellen im Organismus, so hören sie auf, sich weiter zu entwickeln (Kirby, 1968), was als eine Immunreaktion des Wirts gegen den Embryo gedeutet wurde. Damit war ein erster Hinweis auf mögliche embryospezifische Antigene gegeben. Eine Reihe von Experimenten wurde inzwischen unternommen, solche embryonalen Antigene zu charakterisieren (Jacob, 1977). Aus zwei Gründen wurde nach derartigen Strukturen gesucht. Einmal hoffte man, Antigene zu finden, die nur in bestimmten Stadien der Embryonalentwicklung vorkommen (sogenannte stadienspezifische Antigene). Solche Strukturen sind eine große Hilfe beim Studium der Differenzierung und Determinierung; durch Immunmarkierungen lassen sich Entwicklungsvorgänge früher und nach schärferen Kriterien als nach Morphologie oder Ultrastruktur beurteilen. Zum anderen hoffte man Strukturen zu finden, denen sich für die Entwicklung eine bestimmte Funktion zuordnen läßt. Solche Strukturen sollten Aufschluß geben über die molekularen Mechanismen von Zelldifferenzierung und Embryonalentwicklung.

Die Hoffnung, sogenannte primäre Marker zu finden, d.h. Antikörper, die nur in einem Stadium der Entwicklung mit einem bestimmten Zelltyp reagieren, ansonsten aber weder in embryonalen noch adulten Geweben vorkommen, hat sich bisher nicht erfüllt. Sekundäre Marker gibt es dagegen eine ganze Reihe, also solche, die charakteristisch sind für ein bestimmtes Embryonalstadium oder -gewebe, jedoch auch mit

Strukturen zu anderen Zeiten der Entwicklung reagieren.

Versuche, mit Embryonen zu immunisieren, wurden wegen der geringen Menge an Material nur wenige unternommen (Wiley und Calarco, 1975; Johnson und Calarco, 1980). Edidin et al. (1971) immunisierten Mäuse mit einer Teratokarzinom-Ascites Linie. Drei antigene Spezifitäten konnten in dem Antiserum nachgewiesen werden, eines davon war nur an unbefruchteten Eiern, in frühen Morulae und in der Inneren Zellmasse des Blastozysten vorhanden. Artzt et al. haben 1973 Mäuse syngen mit Zellen der EC-Zellinie F9 immunisiert und konnten ein Antigen charakterisieren, das klassische F9-Antigen, das nur in der frühen Entwicklung vom 2-Zellstadium bis zum 8 Tage alten Embryo, an männlichen Keimzellen und an allen EC-Zellinien nachweisbar ist (Buc-Caron et al., 1978). Dem F9-Antigen wurde besondere Beachtung geschenkt, weil es anfangs als Wildtyp-Genprodukt der t^{w32}-Mutation des T/t-Komplexes angesehen wurde, einer Mutation, die homozygot im Morulastadium lethal ist. Weiterführende Untersuchungen konnten diese Ergebnisse nicht bestätigen (Kemler et al. (1976). Die antigenen Determinanten des F9-Antigens liegen in einer Kohlehydrat-Struktur (Buc-Caron und Dupouey, 1980). Über seine Funktion ist nichts bekannt.

Eine der Schwierigkeiten polyklonale Antiseren als Marker zu verwenden, besteht darin, daß solche Seren verschiedene antigene Strukturen erkennen. Erst nach einer Reihe von Absorptionsschritten, in denen begleitende Spezifitäten herausgefangen werden, ist es möglich, die eigentlich interessierenden Strukturen zu charakterisieren. Eine

wesentliche Erleichterung brachte die Einführung der monoklonalen Antikörper durch Köhler und Milstein (1975). Der erste monoklonale Antikörper, der als Marker für embryonale Zellen diente, wurde von Stern et al. (1978) beschrieben. Er reagiert mit allen EC-Zellen. In der Embryonalentwicklung färbt er zuerst das Blastozystenstadium, ist in der weiteren Entwicklung spezifisch für die innere Zellmasse, das primitive Entoderm, für viscerales und parietales Entoderm, nicht aber für embryonales Ektoderm. Darüberhinaus markiert er verschiedene Gewebe der erwachsenen Maus. Solter und Knowles beschrieben 1978 einen monoklonalen Antikörper, der mit einem Antigen (SSEA-1) auf EC-Zellen und Zellen früher Embryonen reagiert. SSEA-1 erscheint im späten 8-Zellstadium, ist auf dem Trophektoderm des Blastozysten nur in geringen Mengen, auf den ICM-Zellen und Entodermzellen dagegen in größeren Mengen nachweisbar, ebenso auf den Zellen des embryonalen Ectoderms. Es besitzt aber eine andere Verteilung als das von Stern beschriebene Antigen und ist - obwohl beides Glykolipide sind - mit diesem nicht identisch.

Eine Reihe von weiteren Markern für EC-Zellen und frühembryonale Stadien wurde inzwischen beschrieben (Goodfellow et al., 1979; Kemler et al., 1979; Kemler, 1981; Shevinsky et al., 1982). Eine tiefergehende Analyse der entsprechenden Antigene wurde dadurch erschwert, daß es sich durchweg, soweit bekannt, um biochemisch schwer in den Griff zu bekommende Glykolipide handelt.

Die Suche nach trophektodermspezifischen Markern führte Brûlet et al. (1980) auf das Zytoskelett der Zelle. TROMA 1,

2 und 3 sind monoklonale Antikörper, die im Trophektoderm des Blastozysten nicht aber der ICM ein Intermediärfilament-Netzwerk markieren. Daneben reagieren sie mit vielen Epithelien der folgenden Entwicklungsstadien und des adulten Tieres (Brûlet et al., 1980; Kemler et al., 1981a, 1981b). Sie reagieren mit Proteinen der Zytokeratin-Familie. Antikörper gegen die verschiedenen Zytokeratin-Proteine haben sich inzwischen als potente Marker nicht nur für die Differenzierung von embryonalen Zellen erwiesen (Jackson et al., 1980, 1981; Franke et al., 1982), sondern auch für die Herkunft und Klassifizierung von Tumoren (Osborn und Weber, 1982).

Die Funktion einer molekularen Struktur läßt sich dadurch untersuchen, daß man versucht, sie durch Blockieren mit einem Antikörper in ihrer Wirkungsweise zu beeinträchtigen. Bei intrazellulären Antigenen muß dazu der Antikörper durch Mikroinjektion oder Membranvesikel in die Zelle gebracht werden (Kreis und Birchmeier, 1982). Einfacher ist es, funktionelle Strukturen der Zelloberfläche zu blockieren. Beug et al. (1970) waren die ersten, die mit Antikörpern Zellerkennung und Zellkontakt blockierten; sie verhinderten bei der Amöbe Dictyostelium die Aggregation und Fruchtkörperbildung durch monovalente Antikörper.

Vieles deutet darauf hin, daß Zellkommunikation und Zellkontakt gerade bei Differenzierungsvorgängen eine herausragende Rolle spielt (Jacob, 1979). Es lag nahe zu versuchen, mit Antikörpern gegen die Zellmembran in das Differenzierungsgeschehen einzugreifen. Im Maussystem gelang

dies erstmals Kemler und Mitarbeitern (Kemler et al., 1977). Mit monovalenten Fab-Fragmenten eines gegen F9-Zellen gerichteten Kaninchenserums konnten sie die Kompaktion des Embryos im 8-Zellstadium verhindern und Teratokarzinomzellen in Kultur dekompaktieren. Die Zellen des Embryos teilten sich normal weiter. Wurde das Antiserum entfernt, so wurde er kompakt und entwickelte sich nach Transfer in den Uterus zu einer normalen Maus. Ausgehend von diesen Experimenten konnte in der Folge nach Trypsinverdau von EC-Zellen ein Glykoprotein mit dem Molekulargewicht 84 000 gereinigt werden, das mit dem Antiserum reagiert und den Effekt der Fab-Fragmente rückgängig macht (Hyafil et al., 1980). Es handelte sich dabei um ein Fragment eines größeren Glykoproteins von 120 000 d (Peyriéras et al. 1983), letzteres wurde Uvomorulin (UM) genannt (Hyafil et al., 1981). Inzwischen gibt es mehrere andere Antiseren und monoklonale Antikörper, die auf Zellen in Kultur und Embryonen - z.T. auch ohne daß Fab-Fragmente nötig sind - einen ähnlichen Effekt haben (Johnson et al., 1979; Shirayoshi et al., 1983; Damsky et al., 1983; Vestweber und Kemler, 1984). Diese Antikörper reagieren außer mit embryonalen und EC-Zellen auch mit einer Vielzahl adulter Gewebe, so etwa mit den meisten Epithelien.

Außer diesen dekompaktierenden Antikörpern sind bisher keine Antikörper gefunden worden, die einen funktionellen Effekt auf Differenzierungsvorgänge der Mausembryonalentwicklung haben.

1.4. Ziel dieser Arbeit

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit einigen Aspekten der frühen Embryonalentwicklung der Maus unter Zuhilfenahme verschiedener Antikörper. Dabei wurde zum einen versucht, Differenzierungsmarker zu charakterisieren, andererseits wurde die Funktion embryonaler Antigene untersucht, um so etwas über die Mechanismen der Differenzierung zu erfahren. Die Untersuchungen lassen sich in drei Gruppen gliedern:

- Eine Reihe von Antikörpern wurde auf ihre Tauglichkeit als Marker in der Immunfluoreszenz untersucht und mit ihrer Hilfe wurde die Differenzierung von F9-Teratokarzinomzellen näher beleuchtet.

- Am System der Teratokarzinomzellen wurde durch Mikroinjektion der - ursprünglich als Marker produzierten - monoklonalen Antikörper TROMA 1 und 3 die Funktion von Intermediärfilamenten näher untersucht.

- Am adulten Gewebe wurde die Lokalisation des Zelladhäsionsmoleküls Uvomorulin vorgenommen, um mehr über seine Art der Beteiligung am Zell-Zell-Kontakt zu erfahren.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Zellinien

F9: Quasi nullipotente EC-Zellinie, nur nach einer geeigneten Induktion differenzierungsfähig. Isoliert aus dem Teratokarzinom OTT 6050 des Mausstammes 129/sv (Bernstine et al., 1973).

T.D.M.1: Trophektodermale Teratokarzinomzellinie, differenzierter Abkömmling aus dem Teratokarzinom OTT 6050 (Nicolas et al., 1976).

3T3: Zellinie von 17-19 Tage alten Maus-Embryonen des Swiss-albino-Stammes (Todaro und Green, 1963).

MDCK: (Madin-Darby canine kidney) Epitheliale Hundenieren-Zellinie (American type culture collection, 1983 Nr. CCL 34).

2.1.2. Antikörper

TROMA 1,2 und 3: Monoklonale Antikörper (Ratte) gegen 3 verschiedene Zytokeratin-Proteine (Brûlet et al., 1980; Kemler et al., 1981a, 1981b).

Anti-Laminin: Monoklonaler Antikörper (Ratte) gegen Laminin.

ECMA 7: Monoklonaler Antikörper (Maus), hergestellt gegen EC-Zellen, reagiért spezifisch mit undifferenzierten Zellen (Kemler, 1980).

Anti-UM: Kaninchen-Antiserum gegen das Zelladhäsionsmolekül Uvomorulin (Vestweber und Kemler, 1984)

LE 61 und LE 65: Monoklonale Antikörper (Maus) gegen zwei verschiedene Zytokeratin-Proteine (Lane, 1982). Die beiden Antikörper wurden freundlicherweise von Herrn Dr. S. Goodman zur Verfügung gestellt.

FITC- und Rhodamin-gekoppelte Antikörper: Cappel Laboratories, über Dynatech, Plochingen

Ferritin-gekoppeltes anti-Ratten IgG: Cappel Laboratories, über Dynatech, Plochingen

2.1.3. Medien und Puffer

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM): Medienküche des MPI für Entwicklungsbiologie

Fötales Kälberserum (FKS): Gibco, Karlsruhe

PBS (Phosphat-gepufferte Saline):

NaCl	9 g
KCl	0,2 g
Na_2HPO_4	1,15g
KH_2PO_4	0,2 g

Mit H_2O auf 1 Liter (pH 7,4)

HEPES-Pufferlösung: Seromed GmbH, München

Injektionspuffer:

0,048	M	K_2HPO_4
0,014	M	NaH_2PO_4
0,0045	M	KH_2PO_4
		pH 7,25

Stabilisationspuffer nach Henderson und Weber

(für die Zytoskelettpräparation):

0,1	M	PIPES (Piperazin-N,N´-bis(2-ethan Sulfonsäure)
5	mM	$MgCl_2$
1	mM	EGTA
4%		PEG (Polyethylenglykol)

2.1.4. Plastikmaterial für die Zellkultur

Zellkulturschalen: Falcon, über LS Labor Service, München

Bakterienschalen: Greiner, Nürtingen

2.1.5. Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, stammten alle Chemikalien in größtmöglichem Reinheitsgrad von den Firmen Merck, Darmstadt oder Sigma, München.

DEAE-Sepharose:	Pharmacia, Uppsala (Schweden)
Triton X-100:	Serva, Heidelberg
Osmiumtetroxid:	Heraeus, Hanau
Uranylacetat:	Riedel de Haen, Hannover-Selze
Epon 812:	Roth, Karlsruhe
Propylenoxid:	Roth, Karlsruhe
Lowicryl K4M:	Herth, München
Methylcellulose (MH 300):	Fluka, Buchs (Schweiz)
Silikonlösung:	Serva, Heidelberg
Protein A:	Pharmacia, Uppsala (Schweden)
Polyethylenglykol:	Fluka, Buchs (Schweiz)

2.1.6. Geräte

Ultrafiltrationszelle:	Amicon, Witten
Zentrifugen:	Heraeus Christ Minifuge Sorvall Superspeed RC 2-B mit Rotor SS 34, Spinco L2 65B (Beckman) mit Rotor SW 41
Mikromanipulator:	Leitz, Wetzlar
Nadelzieher:	Micro-Pipette Puller MI, Industrial Science Associate Inc. New York (USA)
Injektionsnadeln:	No. GC 150f-15 Clark Electro-medical Instruments, Reading (Großbritannien)
Druckvorrichtung zum Mikroinjizieren:	Festo, Dietikon (Schweiz)
Kryostat:	Frigocut 2.700 (Reichert-Jung)
Pyramitom:	Pyramitome 11800 (LKB)
Messerbrecher:	Knifemaker 7800 (LKB)
Ultramikrotome:	Ultrotome IV (LKB) Sorvall MT2-B mit Cryoattachment
Kontrastierungsgerät:	Ultrostainer (LKB)
Fluoreszenzmikroskop:	Dialux 20 EB (Leitz)
Elektronenmikroskope:	Elmiskope Ia und 102 (Siemens)
Eichgitter für die Größenmessung:	Ernst Fullam Inc., New York, USA

2.2. Methoden

2.2.1. Versuchstiere und Embryonen

Embryonen und Gewebe stammten von Mäusen des Stammes 129/sv oder C57bl/6 bzw. aus Ratten des Stammes Lou.

Präimplantationsembryonen wurden Mäusen entnommen, die hormonell stimuliert waren. Dazu wurden 4 Wochen alte weibliche Mäuse im Abstand von 40 Stunden mit jeweils 5 I.E. PMS (pregnant mare serum) und HCG (human chorion gonadotropin) intraperitoneal gespritzt und über Nacht mit Männchen zusammengesetzt. Am nächsten Morgen wurde auf Vaginalplug getestet, das ist ein coagulierter Sekretpfropf der männlichen Samenflüssigkeit in der Vagina. Die Embryonen wurden durch Spülen des Eileiters entnommen, wenn das gewünschte Stadium erreicht war.

2.2.2. Zellkultur

Alle Zellinien wuchsen in DMEM mit 15% fötalem Kälberserum im Brutschrank bei 37 °C und 10% CO_2. Zur Produktion von monoklonalen Antikörpern im größeren Maßstab wurden Hybridom-Zellinien in Schüttelkultur in 500-ml Glasflaschen in DMEM mit 10% fötalem Kälberserum und 20 mM Hepes-Puffer gezogen.

F9-Zellen wurden auf Gelatine-beschichteten Schalen (Artzt et al., 1973) kultiviert. Um von F9-Zellen in Suspension wachsende Aggregate (embryoid bodies) zu erhalten, wurden die Zellen in Bakterienschalen, die nicht für die Zellkultur vorbehandelt sind, ausgesät oder in Schüttelkultur in Medium mit 20 mM Hepes-Puffer gehalten. F9-Zellen wurden zum

Differenzieren induziert, indem dem Kulturmedium 10^{-7} M Retinolsäure zugegeben wurde (Strickland und Mahdavi, 1978).

2.2.3. Antikörperreinigung

Der durch Zentrifugation von den Hybridom-Zellen befreite Kulturüberstand wurde zunächst durch Ultrafiltration auf ein Zehntel seines Volumens eingeengt. Eine Ammoniumsulfatfällung schloß sich an. Dazu wurde der konzentrierte Kulturüberstand auf Eis mit der halben Menge kalter, gesättigter Ammoniumsulfatlösung tropfenweise versetzt; nach 15 Minuten Rühren auf Eis wurde das Präzipitat bei 3500 UpM für 15 Minuten in einer Sorvall Zentrifuge (Rotor SS 34) abzentrifugiert. Das Präzipitat wurde in dem für den nächsten Reinigungsschritt benötigten Puffer aufgenommen und wiederholt gegen diesen dialysiert.

Zur Antikörper-Reinigung wurden die gefällten Kulturüberstände über eine DEAE-Sepharose Säule gegeben. Dazu wurde das Präzipitat der Ammoniumsulfat-Fällung zunächst gegen 0,0175 M Kaliumphosphatpuffer pH 6,3 dialysiert. In einem Volumen von 15 ml wurde es dann auf eine Säule (Länge 25 cm, Durchmesser 1,6 cm) aufgetragen. Der Durchfluß der Säule wurde photometrisch bei 280 nm bestimmt und in Fraktionen zu 1,5 ml gesammelt. Die Fraktionen wurden im Immunfluoreszenztest auf Aktivität getestet, und diejenigen, die die Aktivität enthielten wurden, vereinigt und ein zweites Mal über die Säule gegeben. Die vereinigten aktiven Fraktionen des zweiten Säulenlaufes wurden gegen Injektionspuffer dialysiert, eingeengt zu einer photometrisch bestimmten Konzentration von ca. 3 mg/ml, aliquotiert und bei

-20 °C aufbewahrt.

Die Reinheit der Antikörper wurde gelelektrophoretisch überprüft. Dazu wurden die Proben unter denaturierenden Bedingungen in einem Polyacrylamid-Gel (Lämmli, 1970) aufgetrennt. Die Gele wurden mit Coomassie oder mit Silber gefärbt (Oakley et al., 1980). Außer den Banden für die leichte und die schwere Kette der Antikörper sind keine anderen Banden zu erkennen (Abb. 3).

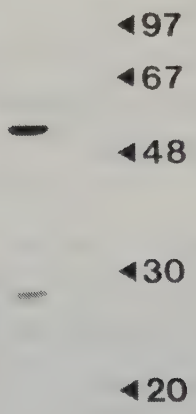

Abb. 3: Gelelektrophorese der gereinigten monoklonalen Antikörper, die zur Mikroinjektion verwendet wurden. a) TROMA 1, b) TROMA 3, rechts Größenmarker (in kD). Es sind jeweils nur zwei Banden, die schwere und die leichte Kette des Antikörpers, zu erkennen.

2.2.4. Indirekte Immunfluoreszenz

Mit der indirekten Immunfluoreszenz weist man den Ort eines

Antigens durch die spezifische Bindung mit einem Antikörper nach. Dabei wird der Antikörper durch einen zweiten, gegen den ersten gerichteten Antikörper sichtbar gemacht, an den ein fluoreszierender Farbstoff gekoppelt ist. Dieser ist in einem Mikroskop mit Fluoreszenzeinrichtung leicht erkennbar. Als Fluoreszenzfarbstoffe haben sich dabei Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und Rhodamin besonders bewährt. Immunfluoreszenz wurde an fixierten Kulturzellen oder an Schnitten von Geweben durchgeführt.

Schnitte von Geweben wurden entweder als Semidünnschnitte am Gefrierultramikrotom gewonnen (siehe Abschnitt Elektronenmikroskopie) oder am herkömmlichen Kryostaten. Für Kryostatschnitte wurde das Gewebe unfixiert in flüssigem Stickstoff eingefroren, auf dem Kryostat in "Tissue Tek", einem geeigneten Einbettmedium, aufgeblockt und bei -20 ^{o} C 10 bis 15 µm dick geschnitten. Die Schnitte wurden auf Poly-Lysin- oder Gelatine-beschichtete Objektträger aufgebracht, angetrocknet und mit 3,7% Formaldehyd oder -20 ^{o}C kaltem Methanol fixiert.

Kulturzellen für die Immunfluoreszenz wuchsen auf Deckgläschen in 30-mm-Kulturschalen. Fixiert wurde je nach der Natur des Antigens mit 2% Formaldehyd in PBS oder mit Methanol bei -20 ^{o}C für 15 Minuten.

Die Zellen oder Schnitte wurden jeweils für 10 bis 30 Minuten mit den Antikörpern inkubiert. Zwischen den Inkubationen wurde mehrfach mit PBS gewaschen. Antiseren wurden in der Regel 1:30 bis 1:100 verdünnt, monoklonale Antikörper dagegen

direkt als Kulturüberstand unverdünnt verwendet. Als Kontrollseren wurden Präimmunseren benutzt, die nach Möglichkeit von dem später immunisierten Tier stammten. Als Kontrolle für die monoklonalen Antikörper wurde der Kulturüberstand eines Hybridoms benutzt, das nur leichte Ketten einer unbekannten Spezifität sekretiert. Die fertigen Präparate wurden in einem Gemisch aus Glycerin und PBS im Verhältnis 3:1 eingedeckelt.

Fotografiert wurde am Fluoreszenz-Mikroskop auf Ilford HP 5-Filme. Die Belichtungszeit betrug für Fluoreszenzaufnahmen zwei Minuten wenn die automatische Belichtungseinrichtung der Kamera nicht zuvor die Belichtungszeit beendete.

2.2.5. Mikroinjektion

Die Technik, Makromoleküle in Kulturzellen zu injizieren, um sie auf biologische Funktion zu untersuchen, geht auf Graessmann (1970) und Diacumakos (1973) zurück. Die hier angewendeten Methoden der Mikroinjektion folgen im wesentlichen deren Prozedur.

Die für die Mikroinjektion und anschließende Immunfluoreszenz bestimmten Zellen wuchsen auf Deckgläschen in Schalen von 30 mm Durchmesser, das übliche Kulturmedium wurde unmittelbar vor der Injektion gegen Injektionsmedium ausgetauscht, das zusätzlich 20 mM Hepes-Puffer enthielt, um den pH-Wert aufrechtzuerhalten.

Injektionsnadeln wurden an einem Nadelzieher hergestellt. Die Füllung der Nadeln geschah von hinten derart, daß sie mit der

Spitze nach oben eine Zeitlang in die zu injizierende Lösung getaucht wurden; die Flüssigkeit lief dann an dem feinen Glasfaden im Innern der Kapillare - bedingt durch Kapillarkräfte - zur Spitze. Injiziert wurde mit Hilfe eines Mikromanipulators, mit Druck aus einer Stickstoffflasche, der sich durch eine Druckvorrichtung feinregulieren ließ. Der einzustellende Druck war abhängig von der benutzten Nadel und betrug im allgemeinen 0,10 bis 0,15 bar. Die injizierten Antikörper waren in Injektionspuffer (siehe unter Material) gelöst in einer Konzentration von etwa 3 mg/ml.

Pro Schale wurden ca. 100 Zellen injiziert, der dafür benötigte Zeitraum betrug 15 bis 20 Minuten. Um injizierte Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop wiederzufinden, wurde dem Antikörper gelegentlich ein irrelevantes, Rhodamin-gekoppeltes Protein beigemischt. Unmittelbar nach der Injektion wurden die Zellen 3- 5 Mal mit 37 ^{o}C warmem Injektionsmedium gewaschen und bis zur Fixierung im Brutschrank in DMEM inkubiert. In der Regel waren das drei Stunden.

Um mikroinjizierte Zellen für die Elektronenmikroskopie verarbeiten zu können, wurde in den Boden von Kulturschalen ein Loch von 7 mm Durchmesser gebohrt, auf das von unten mit Xylol eine Folie geklebt wurde. Nach Sterilisation der so präparierten Schale unter UV-Licht wurden die Zellen darin ausgesät und wuchsen auf der Folie. Mit einem Diamantkratzer, der anstelle eines Objektivs in den Revolver eines umgekehrten Mikroskops geschraubt werden kann, konnte in die Folie ein Kreis mit einem Durchmesser von weniger als einem

Millimeter geritzt werden. Es wurde versucht, möglichst alle Zellen in diesem Bereich zu injizieren, die später leicht im EM wiedergefunden werden konnten.

Zum Darstellen der mikroinjizierten Antikörper im Elektronenmikroskop wurde die Methode der Zytoskelettpräparation von Henderson und Weber (1981) benutzt: Zellen wurden 3 Stunden nach der Mikroinjektion ohne jegliche Fixierung 2 Mal mit Stabilisierungspuffer (siehe unter Material) gewaschen und anschließend für 6 bis 8 Minuten mit 0,2% Triton X-100 in Stabilisierungspuffer extrahiert. Die so vorbehandelten Zellen wurden mit Ferritin-gekoppelten anti-Ratten-IgG 1:40 in Stabilisationspuffer verdünnt inkubiert und anschließend mit 2,5% Glutaraldehyd in PBS fixiert und in Epon eingebettet, wie unten beschrieben.

2.2.6. Elektronenmikroskopie

2.2.6.1. Epon-Einbettung

Die für die Epon-Einbettung bestimmten Zellen und Gewebe wurden in 2,5% Glutaraldehyd in PBS für etwa 2 Stunden bei Raumtemperatur fixiert und anschließend mit PBS zweimal gewaschen. Nachfixiert wurde für 45 Minuten in einer 1%igen Osmiumtetroxidlösung in PBS. Nach mehrmaligem Waschen in bidestilliertem Wasser wurde in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert: Die Präparate kamen jeweils für 10 Minuten in 30-, 50-, 70-, zweimal in 95- und dreimal in 100-prozentiges Ethanol. Der 100%ige Alkohol wurde über Molekularsieb getrocknet und aufbewahrt. Anschließend wurden die Proben über eine Propylenoxid-Epon-Mischung (1:1 für eine

Stunde) in reines Epon 812 überführt (Luft), das nach einigen Stunden erneut gewechselt wurde. Darin verblieben sie über Nacht. Am nächsten Morgen wurde wiederum das Epon gewechselt, nachmittags kamen die Proben dann zur Polymerisation in Gelatinekapseln. Polymerisiert wurde für 48 Stunden bei 60 °C im Trockenschrank. Mikroinjizierte Kulturzellen blieben während der ganzen Prozedur auf der Folie der Kulturschale (Flacheinbettung).

2.2.6.2. Ultradünnschnitte

Die auspolymerisierten Eponblöckchen wurden mit einem Pyramitom pyramidenförmig angespitzt, und am Ultramikrotom wurden mit einem Diamantmesser Ultradünnschnitte einer Dicke von etwa 70 nm angefertigt.

Bei den flacheingebetteten, mikroinjizierten Zellen wurde zunächst aus der Schale ein Bereich von etwa 5-7 mm Durchmesser mit der Laubsäge ausgesägt, der den eingeritzten Kreis mit mikroinjizierten Zellen enthielt. Diese Platte wurde mit der Folie, auf der die Zellen wuchsen, nach oben auf ein Eponblöckchen aufgeklebt. So konnten auch flacheingebettete Präparate in den Präparathalter des Ultramikrotoms eingespannt und angespitzt werden. Die Pyramide wurde in einen Bereich des in die Folie eingeritzten Kreises gelegt und die Folie mit dem Pyramitom vorsichtig weggetrimmt. Nun konnten die mikroinjizierten Zellen problemlos geschnitten werden.

Die Schnitte wurden auf Pioloform-befilmte Kohle-verstärkte Kupfernetzchen (200 mesh) aufgenommen. Alle Eponschnitte

wurden in einem Kontrastierungsgerät mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert.

2.2.6.3. Lowicryl-Einbettung

Lowicryl K4M und HM 20 sind Einbettungsmedien auf Methacrylat-Basis, die speziell für die Einbettung bei tiefen Temperaturen entwickelt wurden (Kellenberger et al.,1980; Armbruster et al., 1982; Carlemalm et al., 1982). Sie wurden ursprünglich konzipiert, um polare (K4M) und unpolare (HM20) Einbettungsmittel zu vergleichen. In der Folge zeigte sich, daß das polare Einbettungsmittel K4M für Immunmarkierungen am Schnitt hervorragend geeignet ist (Roth, 1982).

Proben für die K4M-Einbettung wurden bei Raumtemperatur 1 bis 2 Stunden mit 2% Formaldehyd und 0,2% Glutaraldehyd in PBS fixiert, anschließend 2 Mal mit PBS gewaschen und bei 4 ^{o}C aufbewahrt. Die Entwässerung geschah bei zunehmend tiefen Temperaturen, was sich für die Antigenerhaltung als förderlich erwiesen hat (Armbruster et al.,1983). Für je eine Stunde kamen die Proben in 30% Ethanol (bei 0 ^{o}C), in 50% Ethanol (bei -20 ^{o}C) und in 70%, 95% und zweimal in 100% Ethanol. Die Präparationsschritte ab 70% Alkohol wurden durchweg in einer Tiefkühltruhe bei -35 ^{o}C durchgeführt. Jeweils eine Stunde wurde mit Mischungen aus K4M und Ethanol (1:1 und 2:1) infiltriert, anschließend mit reinem K4M. Über Nacht blieben die Proben im Harz und wurden am nächsten Morgen in frisch angesetztem K4M in Gelatinekapseln eingebracht. K4M ist stark Sauerstoff-empfindlich, Schütteln oder starkes Rühren beim Herstellen der Mischungen mußte daher unbedingt vermieden werden, und die Gelatinekapseln

mußten gut verschlossen werden. Andernfalls wurde das Harz nicht fest. Die Polymerisation geschah in einer eigens dafür konstruierten, Aluminium-ausgekleideten Box unter indirektem UV-Licht (Wellenlänge 360 nm) für 24 Stunden oder länger bei -35 ^{o}C. Anschließend wurde bei Raumtemperatur für ein bis zwei Tage nachpolymerisiert.

K4M ist ein hydrophiles Einbettungsmedium, was die Schneidbarkeit der auspolymerisierten Blöckchen beeinträchtigt. Leicht ziehen sie Wasser und quellen, wenn sie beim Schneiden mit der Flüssigkeit im Trog des Diamanten in Berührung kommen. Ein erneutes Anspitzen ist dann unvermeidlich. Eine Verbesserung der Schneidbarkeit wurde beobachtet, wenn die Blöckchen vor dem Schneiden über Nacht über Phosphorpentoxid getrocknet wurden. Schnitte wurden auf Pioloform-befilmte und Kohle-bedampfte Kupfernetzchen (200 mesh) aufgenommen.

Schnitte von K4M-eingebettetem Material wurden immer erst nach der Immunmarkierung gefärbt. Eine Kontrastierung mit dem Ultrostainer wie bei Eponschnitten erwies sich als zu schwach. Zur Färbung wurden die trockenen Netzchen zunächst für circa 15 Minuten auf einen Tropfen einer 1%igen Uranylacetat-Lösung gelegt, anschließend durch mehrmaliges Schwenken in bidestilliertem Wasser gewaschen und für zwei bis drei Minuten auf einen Tropfen Bleiacetat gebracht. Bleiacetat ist wie viele Bleisalze extrem instabil, in Gegenwart von CO_2 bildet sich schnell unlösliches Bleicarbonat, das in Form elektronendichter Kristalle die Schnitte kontaminiert. Die Bleiacetat-Kontrastierung wurde

daher in einer Glaspetrischale in Gegenwart von Natriumhydroxid-Plätzchen vorgenommen, die das Kohlendioxid binden.

Bleiacetat wurde nach der Methode von Millonig (1961) hergestellt und unter Paraffinöl bei Raumtemperatur mehrere Monate aufbewahrt.

2.2.6.4. Ultradünne Gefrierschnitte

Die Technik, von fixiertem Material Ultradünnschnitte anzufertigen, um darauf Antigene zu lokalisieren, wurde im wesentlichen von Tokuyasu entwickelt (Tokuyasu 1973, 1976, 1978). Seit der Einführung von Protein A-gekoppeltem kolloidalen Gold (PAG) als Immunomarker für die Elektronenmikroskopie (Faulk und Taylor, 1971) hat sie einen bedeutenden Aufschwung erlebt.

Gewebe für die Kryopräparation wurden mit 2% Formaldehyd und 0,2% Glutaraldehyd in PBS bei Raumtemperatur für ein bis zwei Stunden fixiert und anschließend in PBS gewaschen. Aufbewahrt wurden sie anschließend bis zu 3 Tagen in PBS bei 4 ^{o}C. Um die Präparate schneidbar zu machen und um eine Kristallbildung beim Einfrieren zu verhindern, die die Ultrastruktur zerstören würde, wurden die Proben mit Saccharose infiltriert, und zwar entweder in einer Konzentration von 1,6 molar oder 2,3 molar. Wenn die Schneidetemperatur entsprechend gewählt wurde (-70 ^{o}C bzw. -85 ^{o}C), war weder in der Schnittqualität noch in der Erhaltung der Ultrastruktur oder Antigenität ein Unterschied festzustellen. Die Infiltration mit Saccharose dauerte ein

bis zwei Stunden oder wurde über Nacht vorgenommen.

Die Herstellung ultradünner Gefrierschnitte erfordert optimale, schartenfreie Glasmesser. Sie wurden nach der von Tokuyasu (1969) angegebenen Methode angefertigt. Das Prinzip besteht darin, einen Glasstreifen in "perfekte" Quadrate zu brechen, die wiederum möglichst genau in der Diagonale zu den eigentlichen dreieckigen Messern gebrochen werden. Verwendet wurde dazu ein Messerbrecher, zu dem eine Vorrichtung gebaut wurde, die es erlaubte, den Glasstreifen so oft genau in der Mitte zu teilen, bis Quadrate entstehen, die dann unnmittelbar vor dem Schneiden zu Dreiecksmessern gebrochen wurden. Unter dem Binokular des Mikrotoms konnten leicht die besten Messer ausgewählt werden. Geschnitten wurde mit einem Freiwinkel von 6^{o}.

Die Kryoschnitte wurden an einem Ultramikrotom mit Kryoeinrichtung hergestellt. Die Kühlung auf die Schneidetemperatur wird dabei durch flüssigen Stickstoff erreicht. Das Prinzip besteht darin, daß die Ist-Temperatur am Objekthalter der Kühlkammer gemessen und einem Regler zugeführt wird, an dem sich die Soll-Temperatur vorwählen läßt. Steigt die Kammertemperatur an, so wird durch eine Heizung aus einem Vorratsbehälter flüssiger Stickstoff verdampft und in die Kammer geleitet, die dadurch abgekühlt wird. Die dadurch unvermeidlichen Temperaturschwankungen haben allerdings den Nachteil einer ungleichmäßigen Schnittdicke.

Geschnitten wurde bei einer Kammertemperatur von -70 ^{o}C für

Präparate in 1,6 M Saccharose bzw. -85 °C für solche in 2,3 M Saccharose. Die Schnittdicke ließ sich aufgrund der Interferenzfarben grob beurteilen. Die Mehrzahl der Ultradünnschnitte schimmerte golden bis rötlich, was einer Dicke von etwa 100 nm entspricht.

Die Schnitte wurden - nach Möglichkeit als Bänder von 3 bis 5 Schnitten - mit einer Wimper geordnet und zu mehreren auf dem Messerrücken gesammelt. Das Aufnehmen der Schnitte geschah mit einer 2,3 M Saccharose-Lösung. Dazu wurde eine Platindrahtöse von 3 mm Durchmesser in die Zuckerlösung getaucht und in die Gefrierkammer eingeführt. Mit dem gefrierenden Tropfen in der Öse wurden die Schnitte aufgepickt, wobei das Problem darin bestand, den richtigen Zeitpunkt zu wählen. War der Tropfen noch zu flüssig, so verliefen die sofort auftauenden Schnitte und wurden zerrissen, war er schon gefroren, so hafteten die Schnitte nicht. Während des Aufnehmens der Schnitte blieb der Arm in Schneidebewegung, der Vorschub wurde auf Null gestellt. Kryoschnitte wurden auf Objektträger übertragen, indem der aufgetaute Zuckertropfen einfach auf die Oberfläche gepreßt wurde. Für Semidünnschnitte wurden Poly-Lysin-beschichtete Glasobjektträger verwendet, die Schnitte wurden anschließend mit 2% oder 3,7% Formaldehyd oder mit Methanol festfixiert. Ultradünne Schnitte wurden auf Pioloform-befilmte, kohlebedampfte hexagonale oder quadratische Kupfergrids von 200 mesh aufgebracht; dabei erwiesen sich in der nachfolgenden Markierungsprozedur , die ein häufiges Anfassen der Objektträger mit der Pinzette erfordert, die hexagonalen Netzchen als stabiler. Semidünne Schnitte wurden in einer

Küvette mit PBS, ultradünne auf einer Schicht 2% Gelatine in PBS bis zur nachfolgenden Immunmarkierung aufbewahrt.

Ultradünne Gefrierschnitte wurden nach der Markierung gründlich durch Schwenken in bidestilliertem Wasser gewaschen, zum Kontrastieren für 10 Minuten auf Tropfen von 2% neutralem Uranylacetat gelegt, anschließend wieder in Wasser gewaschen, für 3-5 Minuten auf 2% wässriges Uranylacetat gebracht und anschließend ohne Waschschritt auf 1% Methylcellulose gelegt. Bei der ganzen Prozedur mußte darauf geachtet werden, daß die Schnitte zu keinem Zeitpunkt eintrockneten, die feinen Strukturen würden sonst zerstört. Auch die abschließende Einbettung in Methylcellulose dient dazu, die Strukturen beim Trocknen einzuschließen und zu unterstützen. Die auf Methocoel liegenden Objektträger wurden nach etwa 2 Minuten mit einer Platindrahtöse von einem Durchmesser etwas größer als die Netzchen selbst aufgenommen und überschüssige Methylcellulose so abgesaugt, daß ein dünner Film als Support des Schnittes übrigblieb. In der Öse hängend, wurden die Schnitte schließlich getrocknet. Die Immunmarkierung der Kryoschnitte erfolgte im wesentlichen dem von Griffith et al. (1982) angegebenen Protokoll.

2.2.6.5. Herstellung und Koppelung von kolloidalem Gold

Die Einführung von kolloidalem Gold als Immunomarker in der Elektronenmikroskopie geht auf Faulk und Taylor (1971) und Romano und Romano (1977) zurück. Die Einfachheit der Herstellung verschiedener Größen und der Koppelung mit Antikörpern, Protein A und Lectinen und der starke Kontrast im Elektronenmikroskop haben es inzwischen zu dem am meisten

benutzten Marker gemacht.

Herstellung von kolloidalem Gold

Kolloidales Gold wurde auf verschiedene Arten hergestellt. Da das Goldkolloid sehr instabil ist und bereits bei geringen Ionenstärken und Verunreinigungen ausfällt und damit unbrauchbar wird, mußte streng auf Sauberkeit aller Gefäße und Lösungen geachtet werden. Für die Herstellung des kolloidalen Goldes wurden daher auch nur silikonisierte Glasgefäße benutzt.

Citrat-Gold:

1 ml einer 1% Tetrachlorgoldsäure ($HAuCl_4$) wurde zu 100 ml destilliertem Wasser gegeben und gekocht. Anschließend wurden 5 ml einer 1% Trinatriumcitrat-Lösung zugegeben und weiter gekocht bis zum Umschlag der zuvor farblosen Lösung nach weinrot. Die Größe des so hergestellten Goldes (Standardmethode) beträgt ca. 15 nm. Etwas kleinere Goldpartikel ließen sich so herstellen, daß das Wasser zunächst zum Kochen gebracht wurde und erst dann das Trinatrium-Citrat in einer größeren Menge (6-10 ml) zugegeben wurde (Moeremans und de Mey, 1984)

Phosphor-Gold:

Unter Rühren wurden in einen eisgekühlten Kolben mit 60 ml bidestilliertem Wasser 0,75 ml einer 1% $HAuCl_4$-Lösung pipettiert und anschließend 0,7 ml einer frisch hergestellten 0,1 M Kaliumkarbonatlösung. Nach drei Minuten, nachdem die schwach gelbliche Farbe der Tetrachlorgoldsäure verschwunden war, wurden 0,5 ml einer Phosphorätherlösung zugegeben, die

aus einem Teil einer gesättigten Lösung von weißem Phosphor in Äther und vier Teilen Äther frisch hergestellt worden war. Nach 15 bis 20 Minuten wurde die Lösung zunächst braun, dann rot. Anschließend wurde solange gekocht, bis keine Farbänderung mehr eintrat. Die Lösung war nun orange-rot, das kolloidale Gold hatte einen Durchmesser von ca. 5 nm. Für etwas größere Goldpartikel wurde die Lösung wieder auf Eis gestellt, und unter Rühren wurden erneut 0,5 ml der zu 20% gesättigten Phosphor-Äther-Lösung zugegeben. Nach drei Minuten wurden 0,75 ml 1% Tetrachlorgoldsäure zupipettiert und nach 15 bis 20 Minuten, nach Beendigung des Farbwechsels, 0,7 ml der 0,1 M Kaliumkarbonatlösung.Dann wurde erneut gekocht. Dieses Anwachsen der Goldpartikel wurde nötigenfalls wiederholt (Leunissen und van Bergen en Henegouwen, 1984).

Die Größenmessung der so erhaltenen Goldpartikel wurde am Siemens-Elmiskop 102 durchgeführt. Mit einem Lifttisch war es möglich, alle Präparate in gleicher Objektlage aufzunehmen. Damit waren immer exakt gleiche Vergrößerungen gewährleistet. Die absolute Vergrößerung wurde mit einem Eichgitter ermittelt. Ausgemessen wurde auf 5-fach nachvergrößerten Positiven. Parallel dazu wurde das Absorptionsmaximum der jeweiligen Lösung bestimmt. Aus der Farbe des Goldkolloids läßt sich auf die Größe der darin enthaltenen Goldpartikel schließen. Tabelle 1 zeigt die Größen der auf die verschiedenen Arten hergestellten Goldpartikel und das Absorptionsmaximum der Lösungen.

Tabelle 1: Größe von nach verschiedenen Methoden hergestellten Goldpartikeln

Herstellung	Mittelwert	Standard-abweichung	Absorptions-maximum
Phosphor-Gold	4,52 nm	1,13 nm	510 nm
" nach 1x anwachsen	6,05 nm	2,03 nm	512 nm
" nach 2x anwachsen	8,06 nm	1,65 nm	514 nm
Citrat-Gold (nach DeMey)	11,67 nm	1,14 nm	-
Citrat-Gold (Standardmethode)	16,10 nm	1,90 nm	522 nm

Koppelung von Protein A an kolloidales Gold

Der pH-Wert des Goldkolloids wurde mit 0,1 M Kaliumkarbonatlösung mit pH-Papier auf etwa 6 eingestellt. Die benötigte Menge Protein A zur Stabilisierung des Goldes wurde nach der Methode von Slot und Geuze (1981) bestimmt. Von einer Protein A-Stammlösung (1 mg/ml) wurde in einer Mikrotiterplatte eine Verdünnungsreihe hergestellt (je 50 ul) und dazu je 50 ul der Goldlösung gegeben. Nach einigen Minuten zur Stabilisierung des Komplexes wurden 100 ul einer 10% Kochsalzlösung zugegeben. Kolloidales Gold, das nicht von Protein abgesättigt ist, ist sehr instabil und fällt bei höheren Ionenkonzentrationen aus, was an einer Farbänderung von rot nach blau zu erkennen ist. Das Verhältnis von Gold zu Protein A, bei dem das Gold gerade noch nicht ausfällt, ist für die Koppelung das geeignete.

Protein A und kolloidales Gold wurden in dem so bestimmten Verhältnis gemischt, anschließend wurde zur besseren

Stabilisierung 0,05% PEG zugesetzt. Durch zweimaliges Zentrifugieren wurde freies Protein A vom Komplex abgetrennt, und zwar jeweils 45 Minuten bei 15 000 g für Citrat-Gold und bei 125 000 g für Phosphor-Gold. Das Pellet wurde nach dem ersten Zentrifugationsschritt in PBS aufgenommen, nach der zweiten Zentrifugation in dem Rest des Überstandes, der nicht abgesaugt werden konnte. Zur Aufbewahrung wurde der Protein A-Gold-Komplex 1:1 mit 87% Glycerin gemischt, in Eppendorf-Gefäße aliquotiert und entweder flüssig bei -20 °C oder fest bei -80 °C aufbewahrt. Für die Markierung wurden diese Stammlösungen verdünnt, die geeignete Verdünnung wurde in Vorversuchen bestimmt. Sie lag etwa bei 1:100 bis 1:500, je nach Präparation und Goldgröße. Eine Präparation 7 nm kolloidalen Goldes wurde freundlicherweise von Herrn B. Humbel, ETH Zürich, zur Verfügung gestellt.

2.2.6.6. Immunmarkierungen

Immunmarkierungen an Lowicryl-Schnitten

Lowicryl-Schnitte wurden zum Teil mehrere Wochen bis zur Markierung aufbewahrt, ohne daß eine Beeinträchtigung der Markierungseigenschaften zu beobachten war. Zum Unterdrücken unspezifischer Reaktionen kamen die Objektträger zunächst - Schnitt nach unten - für etwa 15 Minuten auf einen Tropfen 0,5% Ovalbumin in PBS, was gleichzeitig die Benetzbarkeit der zuvor hydrophoben Oberfläche der Netzchen förderte. Anschließend kamen sie ohne zu waschen auf eine Lösung des ersten Antikörpers. Das Antiserum wurde in PBS in der Regel ähnlich stark verdünnt wie für die Immunfluoreszenz, für das anti-Uvomorulin-Antiserum war dies 1:30 bis 1:50. Die Inkubation geschah mindestens für zwei Stunden bei

Raumtemperatur, im allgemeinen aber über Nacht bei 4 °C. Danach wurden die Schnitte für 20 bis 30 Minuten durch Übertragen auf 5 bis 7 Tropfen PBS gewaschen und kamen dann auf einen Tropfen des verdünnten Protein A-Gold-Komplexes. Diese Inkubation dauerte ein bis zwei Stunden bei Raumtemperatur. Eine Menge von lo µl verdünnten Antiserums bzw. PAG´s reichte für ein Netzchen aus. Danach wurde wiederum auf etwa 7 Tropfen PBS gewaschen, anschließend durch Schwenken in einem Becherglas mit bidestilliertem Wasser. Vor der Kontrastierung wurden die Schnitte gründlich getrocknet. Die Markierung von K4M-Schnitten erfolgte im wesentlichen wie von Roth (1982) angegeben.

Markierung von Kryoschnitten

Ähnlich ging die Markierung ultradünner Gefrierschnitte vor sich. Die Netzchen wurden vorsichtig von der Gelatine gelöst und auf mehreren Tropfen PBS gewaschen, um die letzten Reste Zucker herauslösen. Dann wurden sie auf einer Lösung von je 0,02 M Glycin, Lysin und Ammoniumchlorid in 0,1 M Phosphatpuffer für 30 Minuten inkubiert, um freie Aldehydgruppen und unspezifische Reaktionen abzublocken. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper und PAG wurde wiederum auf Tropfen durchgeführt, dazwischen wurde mit PBS gewaschen. Beide Lösungen mußten wesentlich stärker verdünnt werden als für die Markierung an Lowicrylschnitten, um den Hintergrund niedrig zu halten. Im allgemeinen wurde das anti-Uvomorulin-Antiserum in einer Verdünnung von 1:100 bis 1:300 verwendet. Abschließend wurden die Präparate auf PBS und danach in Wasser gewaschen und kontrastiert, wie oben beschrieben. Das

Protokoll für die Immunmarkierung folgte im wesentlichen dem von Tokuyasu und Singer (1976).

3. ERGEBNISSE

3.1. Monoklonale Antikörper als Marker für Differenzierung in-vitro und in-vivo

Die meisten Arbeiten, in denen mit Hilfe von Antikörpern Differenzierungsantigene untersucht wurden, konzentrierten sich auf die Charakterisierung von Strukturen, die spezifisch sind für embryonale Stammzellen. Im Gegensatz dazu stehen die monoklonalen Antikörper TROMA 1 und 3. Sie waren hergestellt worden, um ein differenziertes Gewebe, das Trophektoderm des Embryos, zu charakterisieren. Sie reagieren mit Proteinen des Zytokeratin-Zytoskeletts. Mit ihrer Hilfe ist es möglich, nicht das Verschwinden, sondern das Auftreten einer zellulären Struktur in der Entwicklung zu verfolgen. Im folgenden wurden diese beiden Differenzierungsmarker an Schnitten von Maus-Embryonen im Eizylinderstadium und an differenzierenden F9-Zellen untersucht. In die Untersuchung mit einbezogen wurden ein monoklonaler anti-Laminin-Antikörper - er reagiert mit intrazellulären Granula und mit extrazellulären Ablagerungen von Laminin - sowie ECMA 7, ein monoklonaler Antikörper, der mit einer Oberflächenstruktur von EC-Zellen reagiert.

3.1.1. Immunfluoreszenz an Postimplantations-Embryonen

Immunfluoreszenztests wurden an Methanol-fixierten Kryostatschnitten von unfixiertem Gewebe vorgenommen. TROMA 1

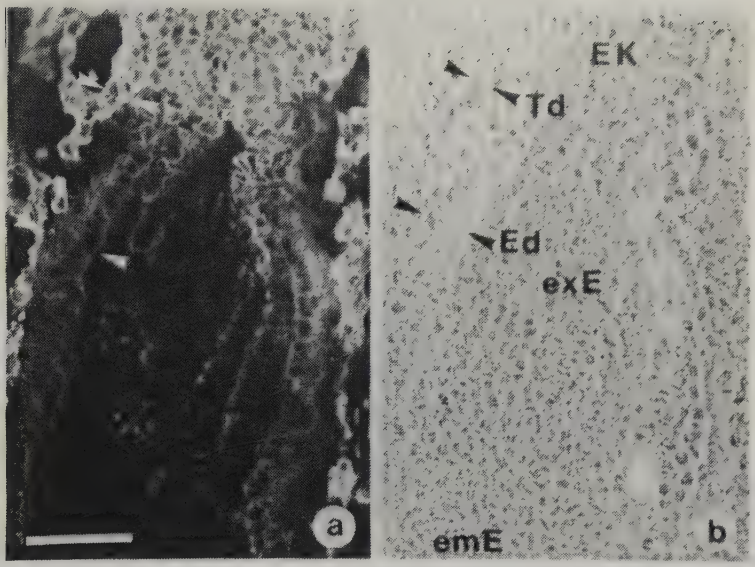

Abb. 4: a) Immunfluoreszenz an einem 8 Tage alten Embryo mit TROMA 1. b) Phasenkontrast zu a) Ed - Entoderm, EK - ektoplazentaler Konus, emE - embryonales Ektoderm, exe - extraembryonales Ektoderm, Td - Trophektoderm. Der Balken in a) entspricht 85 µm.

und 3 reagieren beide stark mit den Zellen des Trophektoderms und des ektoplazentalen Konus (Abb. 4). Schwächer markieren sie das extraembryonale Ektoderm, im embryonalen Teil des Eizylinders sind sie beide negativ (zur Lage der Gewebe vergl. Abb. 2). In allen diesen Fällen gab es keinen Unterschied zwischen TROMA 1 und TROMA 3.

Ein Unterschied zwischen TROMA 1 und 3 war aber in ihrer Reaktivität mit dem Entoderm festzustellen. Der monoklonale Antikörper anti-Laminin erwies sich dabei als geeigneter Marker für das parietale Entoderm: Die vom parietalen Entoderm synthetisierte dicke Basalmembran, die Reichert´sche Membran, enthält große Mengen an Laminin und wird von diesem

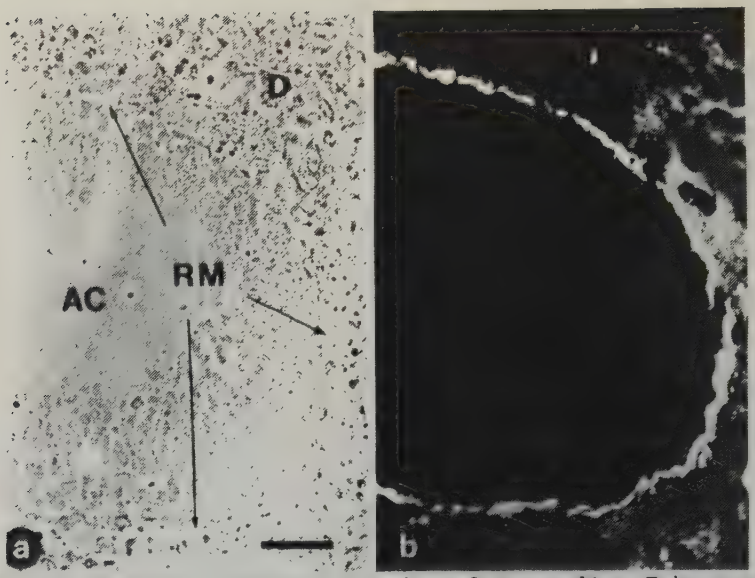

Abb. 5: Immunfluoreszenz an einem 8 Tage alten Embryo mit einem anti-Laminin-Antikörper. a) Phasenkontrast, b) Immunfluoreszenz. AC - amniotic cavity (Amnionhöhle), D - Dezidua, RM - Reichert´sche Membran. Der Balken entspricht 50 µm.

Antikörper stark angefärbt (Abb. 5). Sowohl TROMA 1 als auch TROMA 3 reagierten mit den Zellen des parietalen Entoderms. Im visceralen Entoderm dagegen war nur TROMA 1 positiv, TROMA 3 konnte dort nicht nachgewiesen werden (Abb. 6). Der Unterschied in der Anfärbbarkeit mit diesen beiden Antikörpern bietet ein gutes Unterscheidungsmerkmal für die Zellen des visceralen und des parietalen Entoderms.

Die drei hier untersuchten monoklonalen Antikörper sind also geeignete Marker für sämtlichen Gewebe des Maus-Embryos im Eizylinder-Stadium: Mit den Zellen des parietalen Entoderms reagieren alle 3 Antikörper, mit denen des Trophektoderms und des extraembryonalen Teils des Eizylinders reagieren TROMA 1 und 3, wobei die Reaktion im ektoplazentalen Konus wesentlich

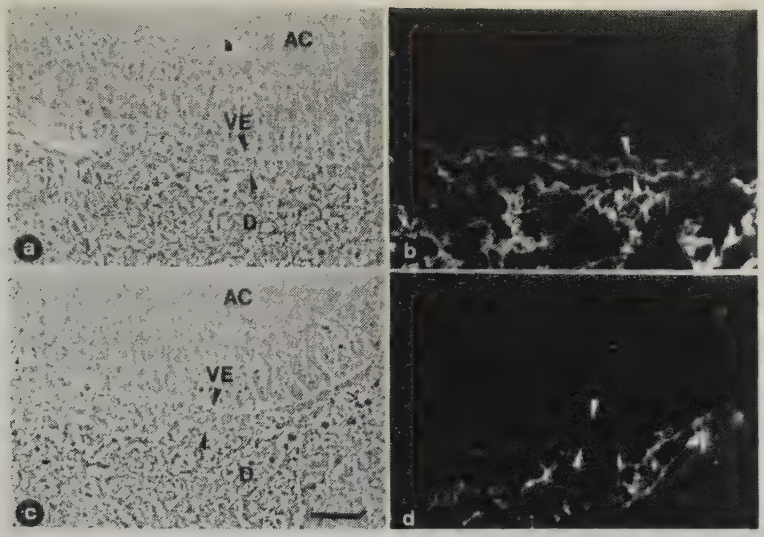

Abb. 6: Unterschiedliche Immunfluoreszenz am 8 Tage alten Embryo mit TROMA 1 und TROMA 3. b) TROMA 1 reagiert mit dem visceralen Entoderm, d) TROMA 3 zeigt am visceralen Entoderm keine Reaktion. a) und c) entsprechende Phasenkontrastaufnahmen. AC - Amnionhöhle, VE - Viscerales Entoderm, D - Dezidua. Balken entspricht 50 µm.

stärker ist als im extraembryonalen Ektoderm. Das viscerale Entoderm färbt sich nur mit TROMA 1, und im embryonalen Teil des Ektoderms sind alle Marker negativ. Mit letzterem reagiert der monoklonale Antikörper ECMA 7 (Kemler 1980).

3.1.2. In-vitro-Differenzierung von attachierten F9-Zellen

F9-Zellen sind EC-Zellen, die in ihrem Differenzierungsstatus etwa den undifferenzierten Zellen der Inneren Zellmasse des Embryos im Blastozystenstadium entsprechen (Hogan et al., 1981). Unter normalen Kulturbedingungen sind sie "quasi nullipotent", also nicht zur Differenzierung fähig. Strickland und Mahdavi (1978) fanden, daß F9-Zellen durch bestimmte Reagenzien wie, Retinolsäure und c-AMP, zum Differenzieren induziert werden können. Es entstehen dann

Zellen des visceralen und parietalen Entoderms, wie Hogan et al. (1981) durch biochemische und morphologische Untersuchungen zeigen konnten. Viscerales Entoderm bildet sich dabei, wenn man die Zellen in Suspensionskultur wachsen läßt als äußere Schicht auf den undifferenzierter Zellen. Parietales Entoderm bildet sich als Monolayer in attachiert wachsenden Zellkulturen. Die oben am Maus-Embryo beschriebenen monoklonalen Antikörper wurden im folgenden benutzt, um diese Differenzierung von EC-Zellen genauer zu untersuchen.

Mit Hilfe von ECMA 7 läßt sich das Differenzieren von F9-Zellen gut verfolgen. Sind in den nicht induzierten Kulturen ca. 95% der Zellen positiv für diesen Marker (die restlichen 5% stellen spontan differenzierte Zellen dar), so beginnt der Prozentsatz 12 Stunden nach der Induktion mit 10^{-7} M Retinolsäure rasch zu sinken. Nach 24 Stunden färben sich nur noch etwa 50%, nach 2 Tagen 25% der Zellen mit ECMA 7 an. Nach 4 Tagen sind praktisch alle Zellen der Kultur negativ für ECMA 7, also differenziert. Umgekehrt dazu reagieren nach Induktion zunehmend mehr Zellen mit TROMA 1, wenngleich die Zunahme an TROMA-positiven Zellen etwas später erfolgt als die Abnahme an ECMA 7-positiven. Nach einem Tag färben sich etwa 25% der Zellen mit TROMA 1, nach zwei Tagen 60%, nach vier Tagen sind es etwa 95%. Das Erscheinen des TROMA 3-Antigens verläuft noch langsamer. Die ersten positiven Zellen sind 24 Stunden nach Induktion nachweisbar, ihr Prozentsatz bleibt immer deutlich unter dem der für TROMA 1 positiven und steigt auf etwa 60 % der gesamten Zellpopulation nach vier Tagen.

Laminin wird - abgesehen von einem geringen Prozentsatz differenzierter Zellen in uninduzierten Kulturen - erstmals 24 Stunden nach Induktion nachweisbar. Die anfängliche Zunahme Laminin-produzierender Zellen verläuft langsam, nach vier Tagen sind etwa 80% aller Zellen in den Kulturen für Laminin positiv. Abb. 7 faßt den zeitlichen Verlauf des Auftretens bzw. Verschwindens der verschiedenen Antigene zusammen.

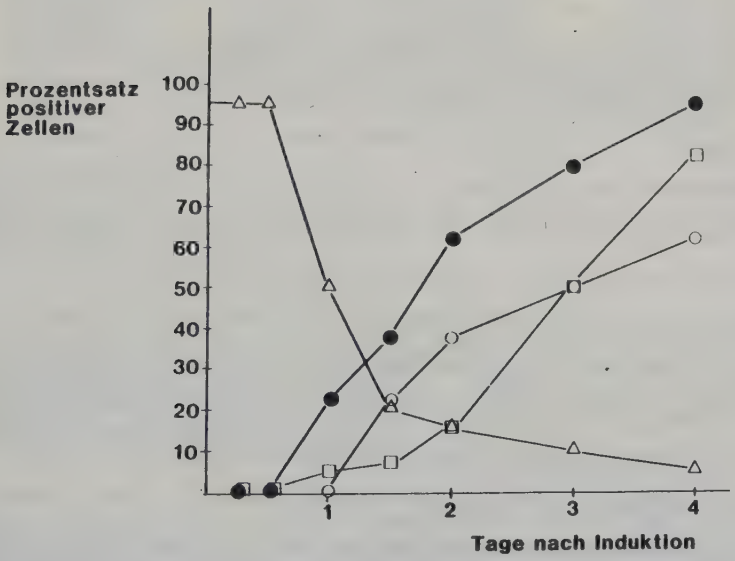

Abb. 7: Reaktion der Marker mit F9-Zellen nach Behandlung mit Retionolsäure. Anteil positiver Zellen für (Δ) ECMA 7, (●) TROMA 1, (○) TROMA 3, (□) anti-Laminin.

Die Differenzierung von F9-Zellen wurde über vier Tage verfolgt. Für die schnell wachsenden Zellen ist das ein recht langer Zeitraum, sodaß das Kulturmedium in dieser Zeit ein- bis zweimal gewechselt werden mußte. Dabei wurde beobachtet,

daß ein großer Anteil der Zellen als Aggregate in Suspension vorlag, die beim Mediumwechsel zum Teil mit abgesaugt wurden. Da die Zusammensetzung der Zellpopulation in den Aggregaten anders ist als bei den ausgebreitet wachsenden epithelartigen Zellen (siehe unten), können die obigen Ergebnisse, insbesondere die zahlenmäßigen Verhältnisse nur für die am Schalenboden haftenden Zellen gelten.

F9-Zellen wachsen normalerweise in stark verklumpten Zellhaufen. Wenn sie differenzieren, bilden sich dagegen flach ausgebreitete Monolayer. Zellen, die mit den TROMA-Antikörpern reagierten, hatten grundsätzlich den differenzierten, ausgebreiteten Phänotyp. Sie wuchsen anfänglich von den Aggregaten der rundlichen undifferenzierten Zellen aus. Innerhalb dieser Klumpen waren für TROMA positive Zellen nie zu beobachten, an der Oberfläche nur selten. Nach vier Tagen Differenzierung waren ohnehin nur noch wenige Zellklumpen in der Kultur. Laminin-positive Zellen traten zunächst auf den Aggregaten auf. In der frühen Phase der Differenzierung (bis zu zwei Tagen) waren Zellen, die sowohl mit TROMA als auch mit anti-Laminin anfärbbar waren, sehr selten. Obwohl anti-Laminin und die beiden TROMA-Antikörper Ratten-Antikörper waren und der indirekte Immunfluoreszenztest benutzt wurde, war es möglich, die granuläre intrazelluläre oder extrazelluläre Laminin-Färbung von der Netzstruktur der TROMA-Färbung zu unterscheiden. In der späten Phase traten auch sehr viele Zellen auf, die mit beiden Markern reagierten. In diesen flach ausgebreiteten Zellen war Laminin vor allem intrazellulär vorhanden. Sowohl die nur TROMA-, als auch die

nur Laminin-positiven Zellen traten vorwiegend in Gruppen auf. Zellen, in denen überhaupt keiner der hier untersuchten

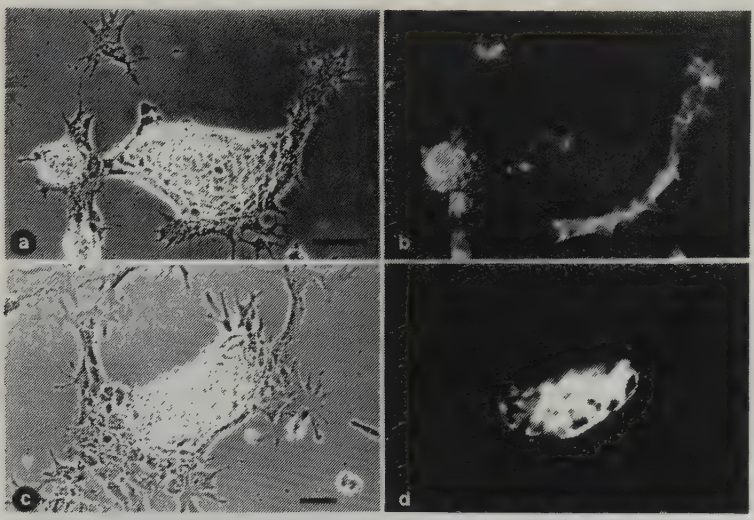

Abb. 8: F9-Zellen nach 4 Tagen Differenzierung. b) Immunfluoreszenz mit TROMA 1, es färben sich die Monolayer-Zellen außerhalb der Aggregate, d) Immunfluoreszenz mit anti-Laminin, es reagieren die Zellen auf den Aggregaten. a) und c) entsprechende Phasenkontrastaufnahmen. Der Balken entspricht 50 μm.

Marker nachzuweisen war, waren in der frühen Phase der Differenzierung recht häufig (ca. 25%), nach vier Tagen dagegen selten (weniger als 10%).

Auffallend ist die starke Ähnlichkeit von attachierten differenzierten F9-Aggregaten und dem Maus-Embryo. Läßt man Embryonen im Blastozysten-Stadium in einer Kulturschale wachsen, so setzen sie sich am Schalenboden fest, das Trophektoderm breitet sich aus und die Innere Zellmasse sitzt als Aggregat auf diesem. Schon morphologisch ähneln sie differenzierten F9-Zellen. Diese Ähnlichkeit wurde durch die Immunfluoreszenz unterstrichen. TROMA 1 und 3 markierten

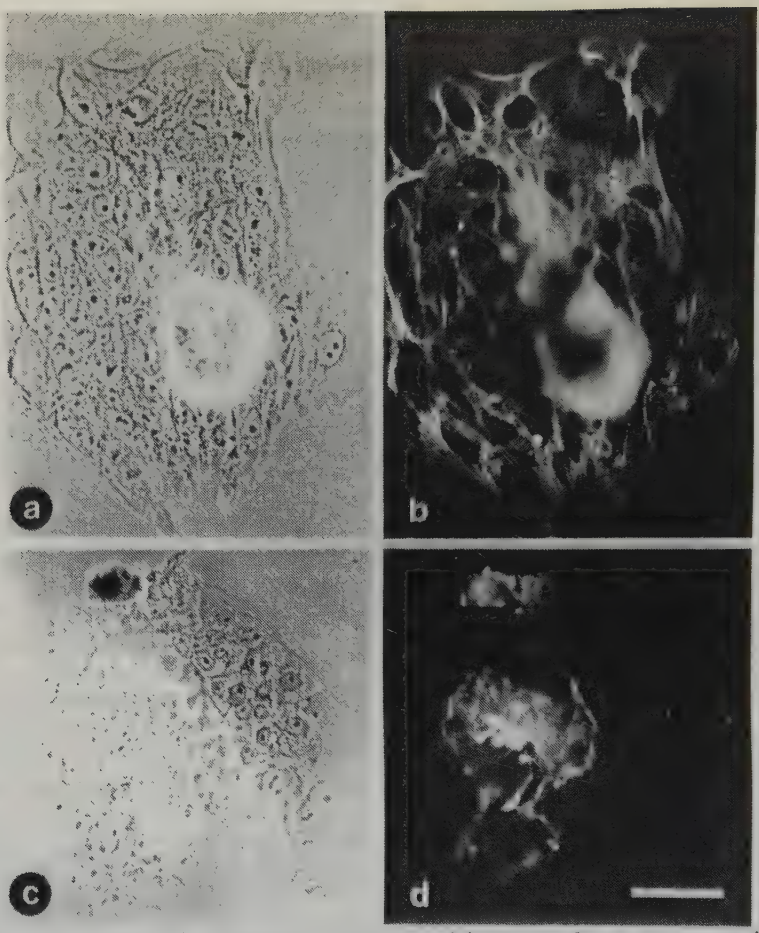

Abb. 9: Immunfluoreszenz am attachierten Blastozysten in-vitro, vgl. mit Abb. 8. b) TROMA 1, es reagieren die am Schalenboden attachierten Monolayerzellen. d) Immunfluoreszenz mit anti-Laminin: Eine Färbung findet sich nur an den Zellen auf der Inneren Zellmasse. Der Balken in d) entspricht 50 µm.

in beiden Fällen nur die flach ausgebreiteten Zellen am Schalenboden, Laminin dagegen war vor allem in den Zellen auf den Aggregaten vorhanden (Abb. 9).

F9-Zellen können nach Retinolsäure-Stimulierung also zu mindestens drei verschiedenen Zelltypen differenzieren,

nämlich zu solchen, die Intermediärfilamente - nachweisbar durch TROMA 1 und 3 - ausbilden, zu solchen, die Laminin produzieren und zu solchen, die beides tun. In der frühen Phase der Differenzierung entsteht dabei zunächst eine heterogene Zellpopulation, nach längerem Differenzieren, herrscht ein Zelltyp vor, der für alle drei Differenzierungsmarker positiv ist.

3.1.3. Differenzierung von in Suspension wachsenden F9-Aggregaten

Um die Differenzierung von in Suspension wachsenden F9-Aggregaten in viscerales Entoderm zu verfolgen, wurden die Zellen vor Induktion für zwei Tage in Bakterienschalen kultiviert. Diese Schalen sind nicht für die Zellkultur vorbehandelt, und Zellen können sich auf dem Schalenboden nicht festsetzen. F9-Zellen bilden dann in Suspension wachsende Aggregate. Diese Zellklumpen wurden zu verschiedenen Zeiten nach Induktion mit Retinolsäure fixiert, am Kryostaten geschnitten und zum Immunfluoreszenztest verwendet.

Nicht-induzierte Aggregate wurden gleichmäßig von ECMA 7 angefärbt, in induzierten dagegen reagierten nur die Zellen im Innern mit ECMA 7. Laminin oder TROMA-positive Zellen erschienen in nicht differenzierten Aggregaten nur zu einem verschwindend geringen Prozentsatz. Nach vier Tagen Induktion zeigten die Klumpen an den äußeren Zellen eine deutliche Färbung mit anti-Laminin, die offenbar extrazellulär war.

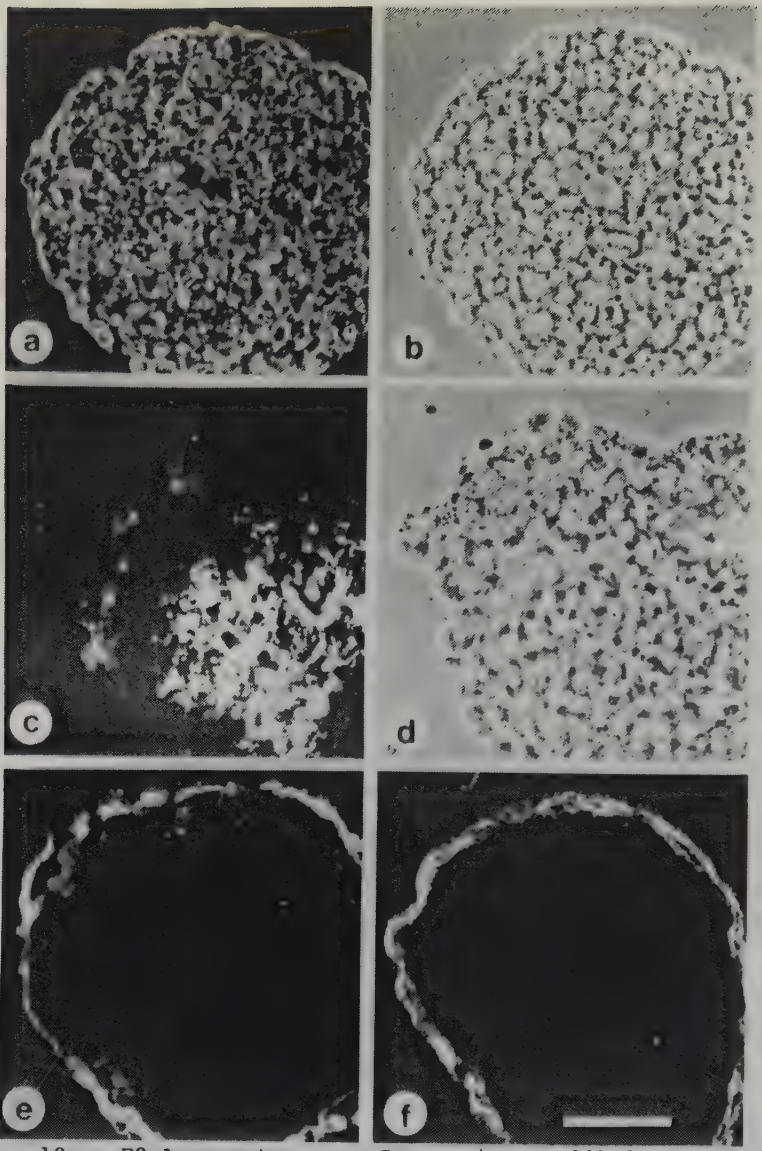

Abb. 10: F9-Aggregate aus Suspensions-Zellkulturen. a) undifferenziertes Aggregat, Immunfluoreszenz mit ECMA 7: Alle Zellen reagieren mit dem Antikörper. b) Phasenkontrast zu a). c) Aggregat nach 4 Tagen Differenzierung: Nur noch Zellen im Innern reagieren mit ECMA 7. d) Phasenkontrast zu c). e) Immunfluoreszenz differenzierter F9-Zellen mit anti-Laminin, es reagiert die Basalmembran unterhalb der äußeren Zellschicht. f) Immunfluoreszenz differenzierter F9-Zellen mit TROMA 1, Nur die äußere Zellschicht reagiert. Solche Aggregate waren aber nicht die Regel in den Kulturen. Der Balken entspricht 100 µm.

Nur in einem geringen Prozentsatz von etwa 10 % der Klumpen erschienen in der äußeren Schicht TROMA 1- und 3-positive Zellen. Das relativiert die obigen Ergebnisse an attachierten Zellen insofern, als derjenige Anteil der Zellen, der nach vier Tagen nicht mehr am Schalenboden festsitzt, sondern in Suspension wächst, dort nicht mitberücksichtigt werden konnte. Eine Auszählung auch dieser Klumpen hätte den Anteil ECMA 7-positiver und TROMA-negativer Zellen erhöht.

3.2. Mikroinjektion von Antikörpern gegen Zytokeratin

TROMA 1, 2 und 3 sind monoklonale Antikörper, die als Marker für das Trophektoderm des Präimplantations-Maus-Embryos selektioniert wurden. Sie reagieren mit Proteinen des Zytokeratin-Zytoskeletts. Die Zytokeratin-Filamente gehören zu den Intermediärfilamenten, die einen Durchmesser von etwa 10 nm haben. Sie durchziehen das Zytoplasma in Form von Filamentbündeln als ein weitgespanntes Netzwerk, das wahrscheinlich zur Stabilität der Zelle beiträgt (Lazarides, 1980). Von einem Antigen, das zu einem bestimmten Zeitpunkt der Embryonalentwicklung auftritt, sollte man erwarten, daß es dann auch eine spezifische Funktion erfüllt. Durch Mikroinjektion der gereinigten Antikörper in die trophektodermalen Zellen der Teratokarzinom-Zellinie T.D.M.1 wurde versucht, etwas über die mögliche Funktion dieser Antigene zu erfahren.

Die Resultate waren mit TROMA 1 und 2 in allen untersuchten Fällen identisch, wogegen zwischen TROMA 1 bzw. 2 und TROMA 3 deutliche Unterschiede festzustellen waren. Im folgenden wird daher nur auf TROMA 1 und 3 näher eingegangen.

TROMA 1 und 3 reagieren mit dem gleichen Zytoskelett-Netzwerk der Zelle. Doppelmarkierungen der beiden Antigene in der indirekten Immunfluoreszenz waren nicht möglich, da beides von der Ratte stammende monoklonale Antikörper sind. Eine direkte Koppelung der Antikörper mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen war immer mit Aktivitätsverlust der Antikörper verbunden. Dennoch ließ sich zeigen, daß TROMA 1

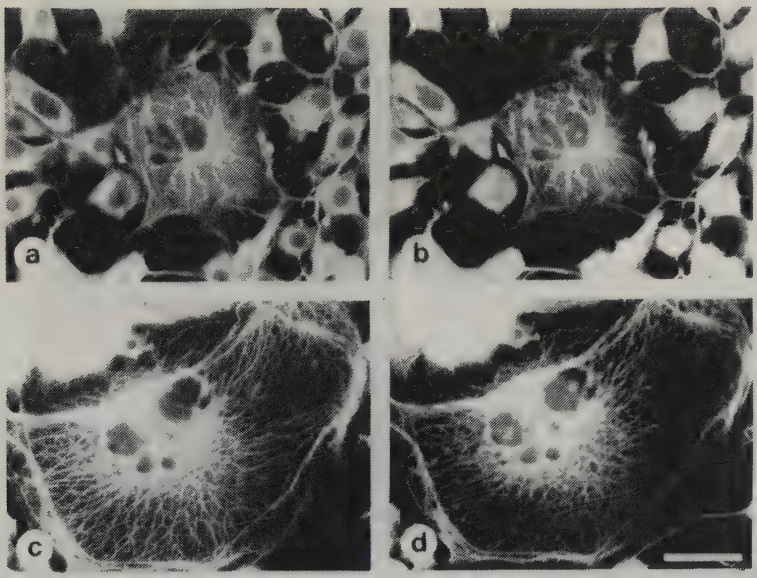

Abb. 11: TROMA 1 und TROMA 3 reagieren mit dem gleichen intrazellulären Netzwerk: a) und b) Doppelmarkierung an T.D.M.1-Zellen mit TROMA 1 und LE 65 resp., c) und d) Doppelmarkierung mit TROMA 3 und LE 65. Der TROMA-Antikörper wurde jeweils mit einem Rhodamin-gekoppelten anti-Ratten-, LE 65 mit einem FITC-gekoppelten anti-Maus-Antikörper sichtbar gemacht. Der Balken entspricht 50 µm.

und TROMA 3 tatsächlich das gleiche Intermediärfilamentsystem erkennen. Doppelmarkierungen zeigten für den anti-Zytokeratin-Antikörper LE61 - einen Maus-monoklonalen Antikörper - einerseits und TROMA 1 bzw. 3 andererseits stets eine identische Markierung (Abb. 11). Folglich reagieren alle drei mit demselben intrazellulären Netzwerk.

Abb. 12 a) zeigt T.D.M.1-Zellen, 3 Stunden nach Mikroinjektion von TROMA 1 und anschließender Immunfluoreszenz mit fluoreszierendem anti-Ratten IgG: Die injizierten Antikörper finden sich als Ring bzw. als Hohlkugel um den Zellkern. Das gleiche Bild ergab sich, wenn

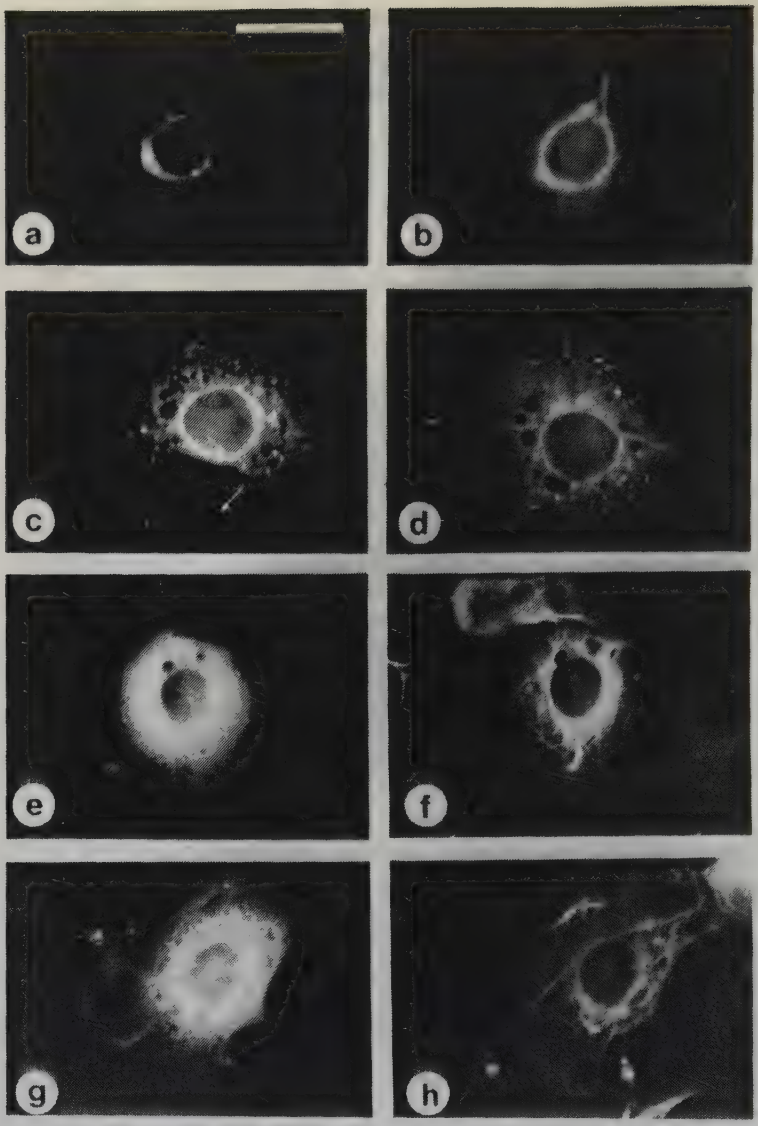

Abb. 12: Mikroinjektion in T.D.M.1-Zellen. a) und b) Mikroinjektion von TROMA 1, in a) Immunfluoreszenz auf die injizierten Antikörper mit anti-Ratten IgG, in b) Immunfluoreszenz mit TROMA 1. c) und d) Mikroinjektion von TROMA 3 und Immunfluoreszenz auf die injizierten Antikörper in c) und mit TROMA 3 in d). e)-h) Kontrollen mit injiziertem Kaninchen-Normalserum. In e) und g) Immunfluoreszenz mit anti-Kaninchen-IgG in f) und g) Immunfluoreszenz an den gleichen Zellen mit TROMA 1 bzw. TROMA 3 resp. Eine Injektion von beliebigen irrelevanten Antikörpern führt zu keiner Aggregation der Intermediärfilamente am Kern. Der Balken in a) entspricht 30 µm.

man nach der Injektion den indirekten Immunfluoreszenztest mit TROMA 1 durchführte (Abb. 12 b). Das von TROMA 1 erkannte Zytoskelett war nicht mehr wie zuvor als Netzwerk sichtbar, sondern um den Kern herum aggregiert. Lediglich in den großen synzytialen Zellen, den für Trophektoderm typischen "giant cells", war zumeist nur ein teilweiser Abbau des Zytoskeletts zu beobachten, Reste zytoplasmatischer Filamente liefen quer durch die Zelle. Den Zellen war ansonsten keine Veränderung anzumerken, im Phasenkontrast waren sie normal ausgebreitet.

Ein gänzlich anderes Bild ergab sich nach Mikroinjektion von TROMA 3. Bei Untersuchung der injizierten Antikörper waren nach drei Stunden in der Fluoreszenz eine von Zelle zu Zelle mehr oder weniger stark diffuse Markierung im Zytoplasma und in peripheren Bereichen der Zelle eine Anzahl fluoreszierender Aggregate zu sehen (Abb. 12c). Ähnliche Aggregate wurden von anderen Arbeitsgruppen in Zusammenhang mit Intermediärfilamenten gefunden und als "Speckles" bezeichnet. Im indirekten Fluoreszenztest war mit TROMA 3 kein Zytoskelett-artiges Netzwerk mehr sichtbar (Abb. 12d). Auch in diesem Falle verhielten sich die Zellen normal und blieben ausgebreitet am Boden der Kulturschale.

Der Effekt der mikroinjizierten Antikörper TROMA 1 und 3 zeigte sich in einigen Zellen bereits etwa 30 Minuten nach Injektion und war nach zwei bis drei Stunden in praktisch allen Zellen voll ausgeprägt. Nur in sehr großen Zellen, wie etwa den im Trophektoderm und in der Zellinie T.D.M.1 häufigen mehrkernigen "giant cells", waren mitunter noch größere Reste des Zytokeratin-Zytoskeletts zu finden.

Mikroinjizierte Zellen wurden bis zu acht Stunden nach der Injektion verfolgt, eine Beeinträchtigung des normalen Zellverhaltens wurde weder durch TROMA 1 noch TROMA 3 beobachtet. All das bestätigt Ergebnisse von Lin und Feramisco (1981) und Gawlitta et al. (1981), die darüber hinaus nachweisen konnten, daß Zellen, deren Intermediärfilament-Zytoskelett durch mikroinjizierte Antikörper zerstört wurde, sich sogar fortbewegen und teilen können.

Eine Verdünnung der mikroinjizierten Antikörper bis 1:4 - entsprechend etwa 0,5 mg/ml - veränderte das Ergebnis nicht. Als Kontrolle wurden gereinigte Antikörper von nicht immunisierten Ratten mikroinjiziert. Diese Antikörper blieben diffus im Zytoplasma verteilt und hatten weder auf die Zellen, noch auf das Zytoskelett irgendeinen Einfluß.

Wurde in T.D.M.1-Zellen TROMA 1 injiziert und anschließend in der indirekten Immunfluoreszenz nach dem TROMA 3-Antigen geschaut, so waren weder ein zytoplasmatisches Netzwerk, noch diffuse Fluoreszenz oder periphere Aggregate zu sehen. Sämtliche nachweisbaren Antikörper waren am Kern lokalisiert (Abb. 13c). In diesem Experiment weist man natürlich auch die mikroinjizierten Antikörper nach, da beides Ratten-Antikörper sind. Es gab aber keinen Hinweis darauf, daß die injizierten (TROMA 1) anders verteilt wären als die in der Immunfluoreszenz getesteten (TROMA 3) Antikörper.

Injiziert man dagegen TROMA 3 und färbt in der Immunfluoreszenz das TROMA 1-Antigen, so findet man

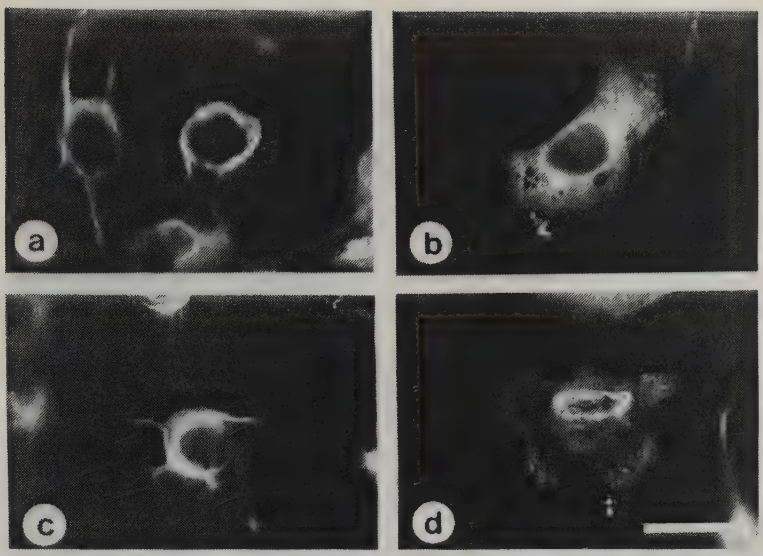

Abb. 13: a) und c) Mikroinjektion von TROMA 1 in T.D.M.1-Zellen, in a) Immunfluoreszenz auf den injizierten Antikörper, in c) Immunfluoreszenz auf TROMA 3, kein Unterschied ist in der Verteilung der beiden Proteine nach Injektion von TROMA 1 zu erkennen.
b) und d) Mikroinjektion von TROMA 3, in b) Immunfluoreszenz mit TROMA 3, in d) Immunfluoreszenz mit TROMA 1. In d) erscheint zusätzlich zu den peripheren Aggregaten und der diffusen Fluoreszenz noch ein Ring um den Kern, der vom TROMA 1-Antigen her stammen muß.
Der Balken in c) entspricht 30 µm.

einerseits die Speckles in peripheren Zellbereichen, die vom injizierten Antikörper her stammen, andererseits zusätzlich dazu eine starke Fluoreszenz um den Kern, die beim Fluoreszenztest auf das TROMA 3-Antigen nicht auftrat, und die daher von TROMA 1 herkommen muß.

Eine zusammenfassende Übersicht über das Verhalten der untersuchten Antigene nach Mikroinjektion von TROMA 1 und 3 gibt Abb. 18.

Ein großer Nachteil für die Lokalisation von TROMA 1 und 3 nach der Injektion des jeweils anderen Antikörpers ist die Tatsache, daß beides monoklonale Antikörper sind, die von der Ratte stammen. In der indirekten Immunfluoreszenz konnten daher immer nur beide Antikörper gleichzeitig nachgewiesen werden. Im Falle der Injektion von TROMA 1 war dies kein Problem, da TROMA 1 und 3 beide am Kern aggregieren. Anders nach Injektion von TROMA 3. Zwar erkennt man nach Test auf TROMA 1 zusätzlich zur TROMA 3-Markierung die Färbung am Zellkern, es ließ sich aber nicht entscheiden, ob das TROMA 1 Antigen nicht auch in den peripheren Aggregaten lokalisiert ist. Es wurde daher mit zwei anderen monoklonalen Antikörpern gegen Zytokeratin-Proteine, LE 61 und LE 65 - beides Maus-IgG´s - untersucht, ob andere Zytokeratin-Proteine in den zytoplasmatischen Aggregaten oder am Kern oder an beiden Stellen zu finden sind. Mit diesen beiden Maus-Antikörpern sind Doppelmarkierungen möglich, da subklassenspezifische, fluoreszenzgekoppelte anti-Maus-IgG-Antikörper zur Verfügung standen.

Abb. 14 zeigt TROMA 1-mikroinjizierte Zellen, die in der indirekten Immunfluoreszenz auf LE 61 getestet wurden. In beiden Fällen ergab sich ein Abbau des Zytokeratin-Zytoskeletts und eine Aggregation am Kern. Wurde TROMA 3 injiziert, so fand man in der Fluoreszenz wiederum LE 61 nur am Zellkern aggregiert, nicht jedoch an der Zellperipherie. Nach der Mikroinjektion von TROMA 3 bricht das gesamte Zytokeratin-Zytoskelett also offenbar zusammen, wobei alle Proteine - zumindest alle untersuchten - am Zellkern aggregieren, bis auf das TROMA 3-Antigen, das diffus

zytoplasmatisch und in Speckles vorliegt.

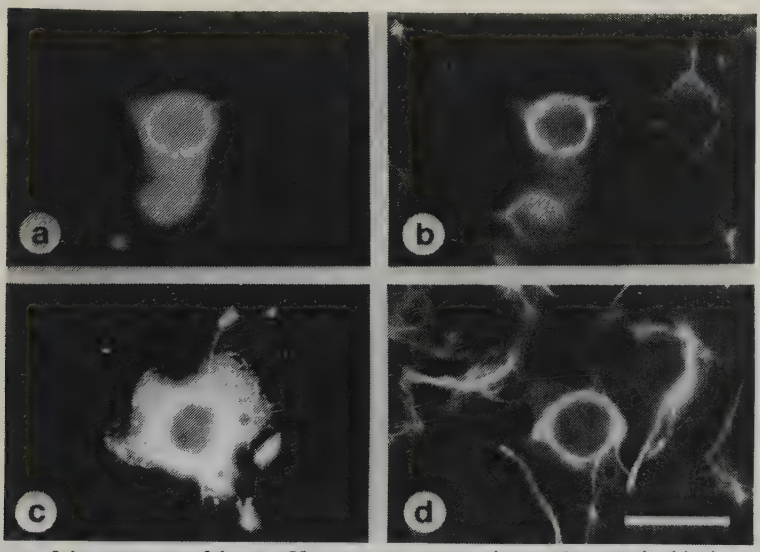

Abb. 14: Doppelimmunfluoreszenz mit dem injizierten Antikörper (a und c) und dem anti-Zytokeratin Antikörper LE 61 in T.D.M.1-Zellen b) und d). a) Mikroinjektion von TROMA 1, b) Mikroinjektion von TROMA 3. In beiden Fällen aggregiert das LE 61-Antigen am Kern. Balken entspricht 30 µm.

Das "speckling" von Intermediärfilament-Proteinen wurde zunächst von Horwitz et al. (1981), von Franke et al. (1982) und Lane et al. (1982) als die mitotische Form des Zytoskeletts in manchen Zelltypen beschrieben, später auch von Klymkowsky (1983) nach Mikroinjektion von Antikörpern. In den Speckles liegen die Intermediärfilamente in einer nicht-filamentösen, granulären Form vor. Um festzustellen ob die TROMA 3-induzierten Aggregate von ähnlicher Beschaffenheit sind wie diese granulären Speckles, wurden mikroinjizierte Zellen mit 0,2% Triton extrahiert, mit Kaninchen anti-Ratten-IgG und Protein A-Gold (PAG) auf die injizierten Antikörper markiert und im Elektronenmikroskop untersucht.

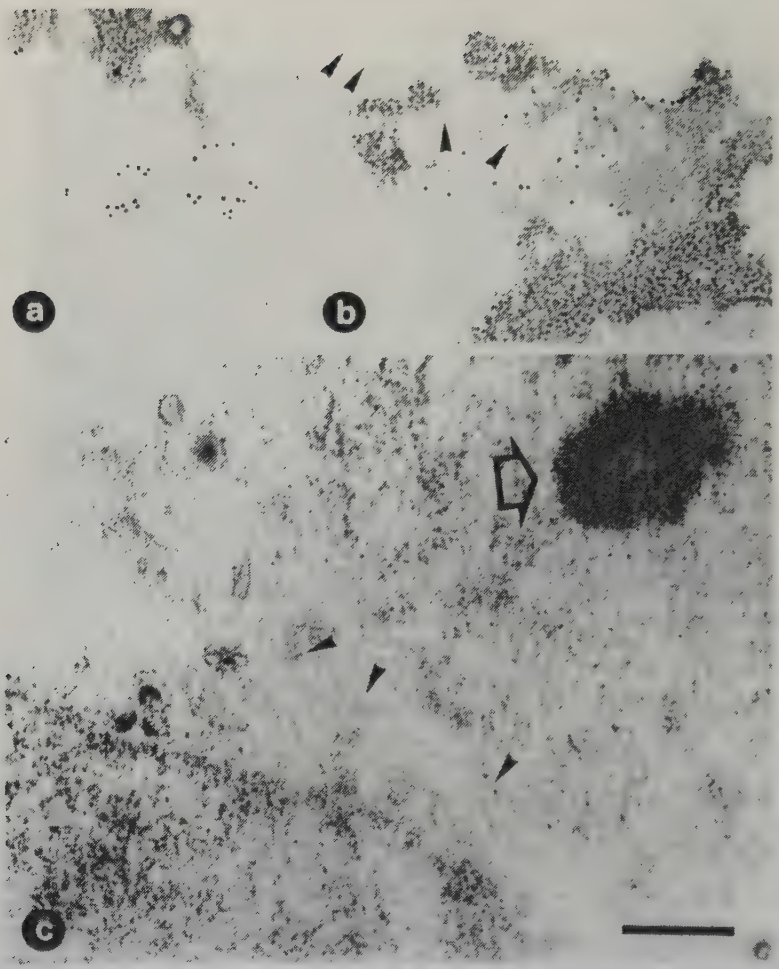

Abb. 15: Mit TROMA 3 injizierte T.D.M.1-Zellen im Elektronenmikroskop. In a) und b) wurden die injizierten Zellen extrahiert und mit Protein A-Gold auf die injizierten Antikörper getestet. Man erkennt rein granuläre Aggregate. In b) ist die häufig beobachtete Assoziation mit Mikrotubuli (Pfeilköpfe) deutlich zu erkennen. c) zeigt eine nicht extrahierte Zelle mit Aggregat (großer Pfeil) und Intermediärfilamenten am Kern (Pfeilköpfe). Der Balken in c) entspricht 500 nm.

Abb. 15 zeigt die PAG-markierten Aggregate von TROMA 3-injizierten Zellen im elektronenmikroskopischen Bild. Sie

sind rein granulöser Natur, nur an wenigen Stellen läßt sich eine Verbindung mit fibrillären 10-nm-Filamenten feststellen. Sie gleichen also zumindest im elektronenmikroskopischen Erscheinungsbild den von Franke et al. (1982) und Klymkowsky (1983) beschriebenen Strukturen.

Da die Speckles ursprünglich in der Mitose beobachtet wurden, lag es nahe, Zellen in der Teilung auf die Verteilung von TROMA 1-und 3-Antigen hin zu untersuchen. Dazu wurden Zellen nach der Immunfluoreszenz mit einem Fluoreszenzfarbstoff, der mit dem Chromatin reagiert (Hoechst 33258), gegengefärbt. Mitotische Zellen ließen sich so an den kondensierten Chromosomen leicht erkennen. Beide Antigene sowie LE 61 und LE 65 waren in der Mitose in fibrillären Bündeln um den Kern der runden, in der Teilung nicht attachierten Zellen herum angeordnet. In keinem Falle waren Speckles, nicht-filamentöse Aggregate zu sehen. Insbesondere liegt das TROMA 3-Antigen in der Mitose ebenfalls in filamentöser Form vor.

Das "Abtrennen" des TROMA 3-Antigens von allen anderen untersuchten Zytokeratin-Proteinen nach Injektion von TROMA 3 kommt also offenbar nur nach den künstlichen Bedingungen der Mikroinjektion zustande. Eine solche Trennung eines Zytokeratin-Proteins von den Intermediärfilamenten wurde bisher nirgends beschrieben. Wenn zytoplasmatische Aggregate in der Mitose oder nach Mikroinjektion auftreten, so sind stets sämtliche Zytokeratin-Proteine dort vereinigt. Diesem Verhalten des TROMA 3-Antigens muß jedoch ein biologisches Phänomen zugrunde liegen. So könnte es zum Beispiel kein echtes Strukturprotein der Intermediärfilamente sein, sondern

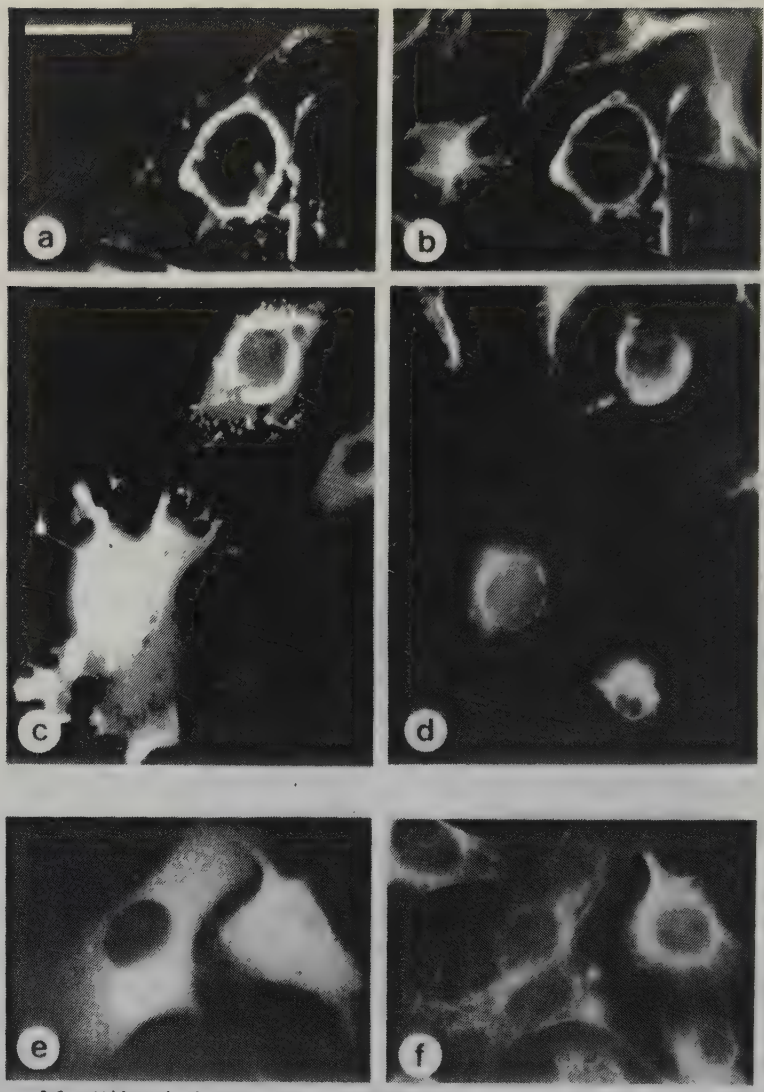

Abb. 16: Mikroinjektion von TROMA 1 a),b) und TROMA 3 c), d) in T.D.M.1-Zellen und Immunfluoreszenztest auf Vimentin b) bzw. d). Das Vimentincytoskelett ist in beiden Fällen am Kern kollabiert. In e) wurde TROMA 3 in 3T3-Zellen injiziert, die das Antigen nicht enthalten, wohl aber Vimentin. Das Vimentin-Netzwerk in diesen Zellen (f)) ist nicht beeinträchtigt. Balken entspricht 30 µm.

eine Funktion in der Regulation oder Stabilisierung des

Zytoskeletts haben oder an der Assoziation mit anderen Zellorganellen beteiligt sein.

Um die mögliche Funktion des TROMA 3-Antigens näher zu untersuchen, wurde nach weiteren Unterschieden zwischen TROMA 1 und 3 gesucht. Das Vimentin-Zytoskelett ist ein anderes Intermediärfilament-Netzwerk, das im Gegensatz zum Zytokeratin-Zytoskelett lediglich aus einem einzigen Protein, eben dem Vimentin, besteht. Es kommt in fast allen kultivierten Zellen vor. Injiziert man TROMA 1 in T.D.M.1-Zellen, so wird das Vimentin-Netzwerk stark beeinträchtigt, das zuvor ausgebreitete Netzwerk kollabiert am Kern. Exakt das gleiche Bild erhält man nach Mikroinjektion von TROMA 3. Wird zur Kontrolle TROMA 3 in 3T3-Zellen injiziert, das sind Gewebekulturzellen, die wohl Vimentin, nicht aber das TROMA 3-Antigen enthalten, so ist das Vimentin-Netzwerk in keiner Weise beeinträchtigt. Zytokeratin und Vimentin-Zytoskelett sind also - obwohl voneinander getrennte Netzwerke - auf irgendeine Weise miteinander gekoppelt. Zwischen dem TROMA 1- und 3-Antigen ist in dieser Hinsicht allerdings kein Unterschied festzustellen.

In den elektronenmikroskopischen Präparaten der Speckles fiel auf, daß diese häufig mit Mikrotubuli assoziiert waren. Es wurde daher untersucht, ob zwischen Mikrotubuli und dem TROMA 1- bzw. 3-Antigen ein funktioneller Zusammenhang besteht. Behandelt man T.D.M.1-Zellen in der Kulturschale mit 0,5 µg/ml Colchicin, so disaggregieren die Mikrotubuli, wie man durch Immunfluoreszenz zeigen kann (Matsui et al., 1972), das Zytokeratin-Netzwerk bleibt davon jedoch unberührt. Wurde das

Zytokeratin-Zytoskelett durch Injektion von Antikörpern zerstört, so hatte das keinen Einfluß auf das Netzwerk der Mikrotubuli. Möglich wäre es, daß zwischen dem TROMA 3-Antigen und den Mikrotubuli eine Verbindung besteht und die Speckles nur durch Mikrotubuli an der Zellperipherie festgehalten werden. Das ist nicht der Fall. Wurden die Mikrotubuli durch Colchicin disaggregiert und TROMA 3 in die Zellen injiziert, so waren im Zytoplasma die gleichen Aggregate wie mit intakten Mikrotubuli zu sehen. Ein Zusammenhang zwischen Mikrotubuli und dem TROMA 3-Antigen, wie er in der Elektronenmikroskopie sichtbar ist, konnte durch diese Experimente nicht untermauert werden.

TROMA 1 und 3 sind Strukturen, die in der Entwicklung sehr früh auftreten, nämlich bereits im Trophektoderm. Es wurde untersucht, ob die an Teratokarzinomzellen gewonnenen Ergebnisse auf embryonale Zellen übertragbar sind. Läßt man

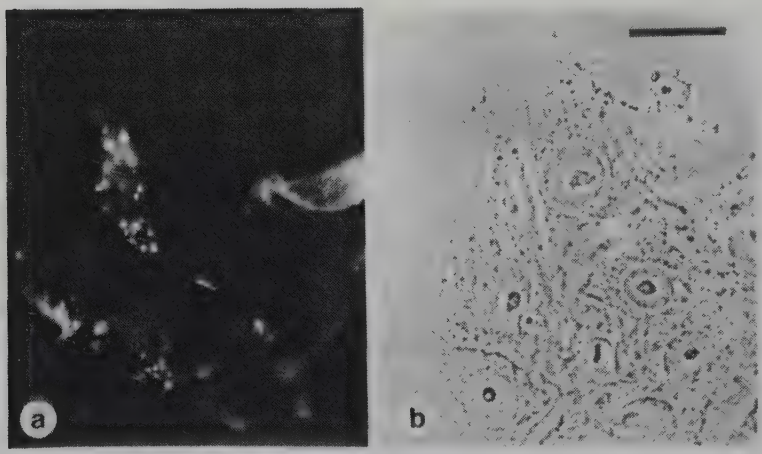

Abb. 17: Mikroinjektion von TROMA 3 in Trophektodermzellen eines in-vitro attachierten Blastozysten. Es sind periphere Aggregate zu erkennen wie in mikroinjizierten T.D.M.1-Zellen.

Blastozysten in Kulturschalen wachsen, so heften sie sich mit dem Trophektoderm an den Boden der Schale, die Innere Zellmasse sitzt als Zellhaufen auf diesem. Die Trophektodermzellen breiten sich aus, so daß es leicht möglich ist, sie zu mikroinjizieren.

Abb. 17 zeigt mikroinjizierte Trophektodermzellen eines attachierten Blastozysten. Erwartungsgemäß findet man nach Injektion von TROMA 1 und Nachweis der injizierten Antkörper wieder eine Aggregation am Kern, nach Injektion von TROMA 3 dagegen periphere Speckles. Die Zellen des Embryos reagieren also auf die Injektion ebenso wie die Kulturzellen. Man kann daher wohl annehmen, daß die obigen Ergebnisse generell auf andere Zellen, insbesondere embryonale, übertragbar sind.

Abb. 18: Übersicht über den Effekt der injizierten Antikörper TROMA 1 und 3, auf die verschiedenen untersuchten Antigene.

3.3. Subzelluläre Lokalisation von Uvomorulin

Das Zelladhäsionsmolekül Uvomorulin (UM) spielt eine bedeutende Rolle in der frühen Embryonalentwicklung der Maus. Wird es durch Antikörper blockiert, so kann der Embryo im 8-Zellstadium nicht kompaktieren, und die Differenzierung zum Blastozysten unterbleibt. Über den Funktionsmechanismus von UM ist bisher nichts bekannt. Eine ultrastrukturelle Lokalisation und die mögliche Assoziation mit irgendwelchen Zelladhäsionsstrukturen sollte über die Art der Beteiligung von Uvomorulin am Zell-Zell-Kontakt Aufschluß geben.

3.3.1. Immunfluoreszenz von Uvomorulin an Kulturzellen

Die bisher beschriebene Lokalisation von UM im Immunfluoreszenztest war an Methanol-fixiertem Material vorgenommen worden (Vestweber und Kemler, 1984). An Methanol-fixierten F9-Zellen erhält man das Bild einer diffusen Fluoreszenz auf der Zelloberfläche und einer leichten Anreicherung zwischen aneinandergrenzenden Zellen (Abb. 19a). Es läßt sich aber nicht zweifelsfrei entscheiden, ob diese etwas stärkere Fluoreszenz auf einem Fokussierungseffekt beruht, oder darauf, daß Uvomorulin an diesen Stellen tatsächlich in größerer Menge vorliegt.

Ein deutlicheres Ergebnis wurde erzielt, wenn F9-Zellen mit 2% oder 4% Formaldehyd für die Immunfluoreszenz fixiert wurden. Nun wurde eine scharfe fluoreszierende Linie an den Bereichen der Zellkontaktflächen sichtbar. Auch auf der Oberseite der Zellen sieht man stellenweise helle Areale,

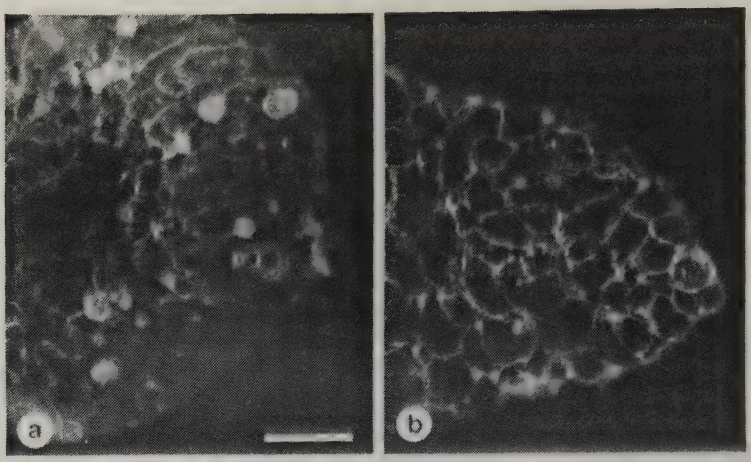

Abb. 19: F9-Aggregate, in der Immunfluoreszenz auf Uvomorulin gefärbt. a) nach Methanol-Fixierung, b) nach Formaldehyd-Fixierung. Der Balken in a) entspricht 50 µm.

wenn auch die Zelloberfläche der meisten Zellen kaum fluoresziert (Abb.19). Die fixierende Wirkung von Aldehyden beruht vor allem auf einer vernetzenden Reaktion mit Proteinen, die weit weniger gut verstandene Wirkung von Alkoholen eher auf einem wasserentziehenden "Ausfällen" der Proteine unter gleichzeitigem Extrahieren der Lipide. Den Ergebnissen mit Formaldehyd-fixiertem Material muß daher wohl mehr Bedeutung zugemessen werden, zumal die immobilisierende Wirkung von Aldehyden auf Membranproteine bekannt ist (de Petris und Raff, 1973). Uvomorulin ist an undifferenzierten F9-Zellen also verstärkt in Zellkontakt-Bereichen, in geringerem Ausmaß an der Oberseite der Zellen - und dort nicht gleichmäßig verteilt - vorhanden.

MDCK-Zellen sind epitheliale Gewebekulturzellen, die in der Kulturschale einen geschlossenen Verband bilden. Sie besitzen

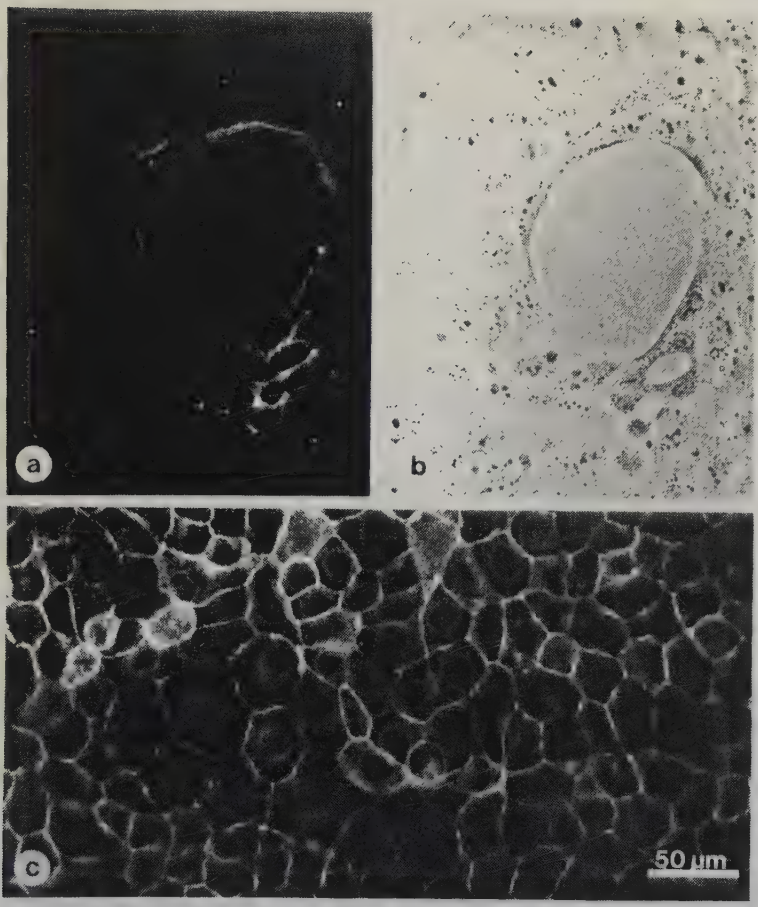

Abb. 20: MDCK-Zellen, Immunfluoreszenztest auf Uvomorulin. a) Formaldehyd-Fixierung, zwischen den Zellen ist keine Markierung zu erkennen, nur die freien Zellgrenzen zeigen eine schwache Fluoreszenz. b) Phasenkontrastaufnahme zu a). c) Tritonbehandlung nach vorausgegangener Formaldehyd-fixierung, sämtliche Zellgrenzen werden angefärbt.

einen Verbindungskomplex (Junctional complex) aus Tight junctions (Zonula occludens), Intermediate junctions (Zonula adhaerens) und Desmosomen, so wie ein Verband aus Epithelzellen. Im funktionellen Test ist das anti-UM-Antiserum in der Lage, auch MDCK-Zellen zu dekompaktieren. Abb. 20 zeigt die Immunfluoreszenz von UM an MDCK-Zellen.

Nach Fixierung mit Formaldehyd allein war UM nicht nachzuweisen. Anders, wenn die Zellen nach der Fixierung für 6 Minuten mit 1% Triton X-100 behandelt wurden. Nun wurde eine scharfe Markierung rund um die Zellen sichtbar. Offenbar ist Uvomorulin im Zellverband von MDCK-Zellen von außen nicht erreichbar, wenn nicht die Zellmembranen durch Methanol oder Detergenz für Antikörper durchlässig gemacht werden.

Auffallend war, daß häufig eine Markierung an freien Zellgrenzen zu beobachten war, also dort, wo eine Zelle nicht mit einer Nachbarzelle verbunden ist, sondern der geschlossene Verband endet (Abb. 20a). Hier ist UM auch ohne eine Tritonbehandlung nach Formaldehyd-Fixierung zugänglich.

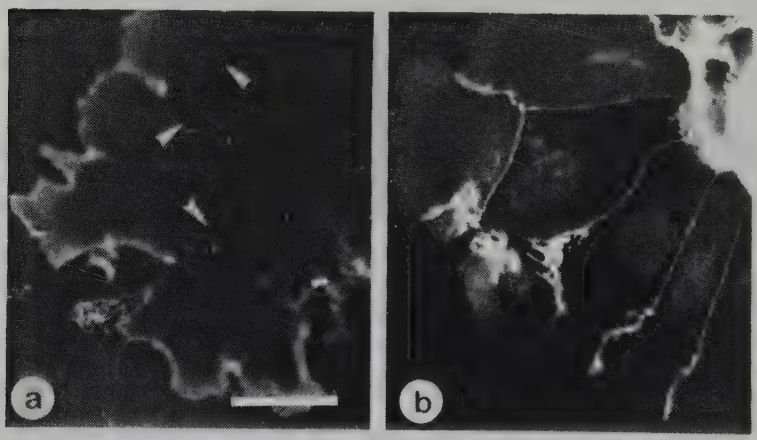

Abb. 21: Immunfluoreszenz auf Uvomorulin an differenzierten F9-Zellen. Fokussiert wurde auf die Zelloberfläche. a) Formaldehyd-Fixierung, nur an freien Zellgrenzen ist eine Markierung zu finden, nicht aber an Zell-Zellkontakten (Pfeilköpfe) b) Tritonbehandlung nach Formaldehyd-Fixierung, die Kontaktbereiche zwischen den Zellen werden deutlich markiert.

Ganz ähnlich verhielten sich F9-Zellen, nachdem sie durch Retinolsäure zum Differenzieren induziert worden waren. An manchen Stellen in der Kulturschale, wo die Zellen epithelartig auswuchsen, waren nach Formaldehydfixierung allein keine Grenzen zwischen benachbarten Zellen sichtbar, wurden sie jedoch anschließend mit 1% Triton behandelt, so wurde eine scharfe Trennlinie in der Immunfluoreszenz sichtbar (Abb. 21). Im Verlauf der Differenzierung wird das Antigen also unzugänglich für die Antikörper. Es muß eine Umverteilung des Moleküls von der freien Zellmembran zu den Stellen des Zell-Zellkontaktes stattfinden.

3.3.2. Immunfluoreszenz von Uvomorulin am Dünndarm

Studien über Zelladhäsionsstrukturen wurden vorwiegend am Darmepithel gemacht. Der Junctional complex des Dünndarmes ist gut untersucht und genau beschrieben (Farquhar und Palade, 1963). Da Uvomorulin am Dünndarmepithel vohanden ist (Vestweber und Kemler, 1984), bot es sich für die ultrastrukturelle Lokalisation am Gewebe besonders an.

Auch am Mausdünndarm war ein starker Unterschied in der Immunfluoreszenz mit verschiedenen Fixierungen zu beobachten. Wurde das Gewebe unfixiert in flüssigem Stickstoff eingefroren, am Kryostaten oder Ultramikrotom bei -30 °C geschnitten, und wurden die Schnitte auf dem Objektträger getrocknet und anschließend mit Methanol bei -20 °C fixiert, so ergab sich eine Fluoreszenz im gesamten basolateralen Bereich der Epithelzellen (Abb. 22). Die laterale Zellmembran schien oft im apikalen Bereich schärfer und heller. Fixierung der Schnitte mit 3,7% Formaldehyd zeigte diese

Fluoreszenz im apikalen Bereich noch deutlicher (Abb. 22b).

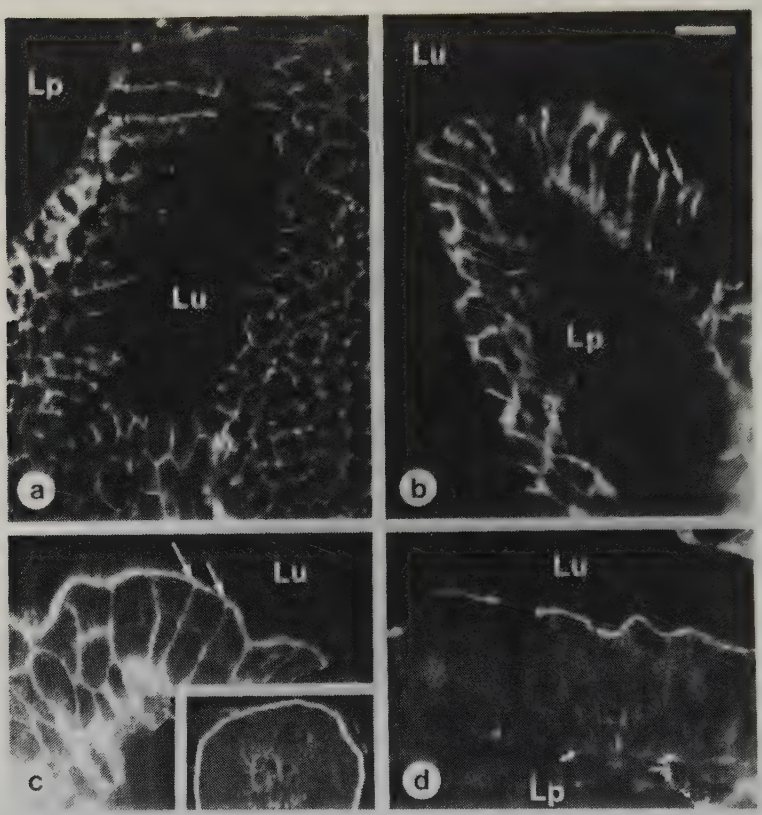

Abb. 22: Immunfluoreszenz von Uvomorulin am Mausdünndarm nach verschiedenen Präparationsverfahren. a) Kryostatschnitt, Methanol-fixiert, b) Kryostatschnitt, mit 4% Formaldehyd vorfixiert. c) Semidünner Gefrierschnitt, fixiert mit 2% Formaldehyd und 0,2% Glutaraldehyd, Inset in c) reine Glutaraldehyd-Fixierung, d) Präimmunserum am Semidünnschnitt nach Formaldehyd/Glutaraldehyd-Fixierung. Pfeile in b) und c) zeigen auf Intermediate junctions. Glutaraldehyd führt zu einer starken unspezifischen Markierung des Bürstensaumes. Der Balken entspricht 20 µm.

Wurde das frische Gewebe dagegen nicht sofort eingefroren, sondern mit 2% Formaldehyd und 0,2% Glutaraldehyd vorfixiert, in Sucrose am Gefriermikrotom semidünngeschnitten, und wurden die Schnitte mit 3,7% Formaldehyd am Objektträger

festfixiert, so zeigte sich ein anderes Bild: Neben einer recht schwachen Fluoreszenz rund um die Zelle wurde besonders der Bürstensaum als ein breites fluoreszierendes Band markiert. Diese Markierung trat mit den verschiedenen anti-UM-Antiseren in unterschiedlichem Ausmaß auf und war in den Kontrollen mit einigen Kaninchen-Präimmunseren genauso stark (Abb. 22c und d). Auch in der Immunelektronenmikroskopie (s.u.) war diese Reaktion bei manchen Präparationen zu beobachten, war aber nie an eine Uvomorulin-Markierung an anderen Stellen der Zelle gekoppelt. Es handelt sich dabei also um eine unspezifische Reaktion vieler Kaninchenseren wahrscheinlich mit Zuckerresten der an Glykoproteinen und -lipiden reichen apikalen Membran der Darmepithelzellen.

Wurden Formaldehyd-Glutaraldehyd-fixierte Gewebe nach dem Schneiden mit Methanol nachfixiert, so verschwand die unspezifische Reaktion an den Mikrovilli. Die anti-UM-Färbung an der basolateralen Membran wurde deutlicher. Besonders stark war sie im apikalen Bereich des Junctional complex. Auch in diesem Fall zerstörte Glutaraldehyd in größeren Konzentrationen die Reaktion.

Am deutlichsten wurde die Lokalisation von Uvomorulin am Dünndarm in der Immunfluoreszenz daher, wenn das Gewebe nur mit 2% Formaldehyd vorfixiert wurde, in 2,3 M Saccharose am Gefriermikrotom geschnitten wurde und die Semidünnschnitte mit Methanol nachfixiert wurden. Abb. 23 zeigt ein solchermaßen hergestelltes Präparat: Im Gebiet des Verbindungskomplexes zwischen den Epithelzellen ist eine sehr

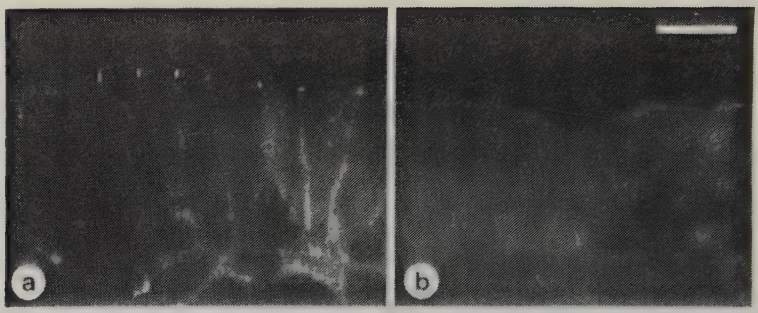

Abb. 23: Immunfluoreszenz von Uvomorulin am Semidünnschnitt vom Mausdünndarm nach feiner Formaldehyd-Fixierung. Im Bereich des Abschlußkomplexes ist eine deutliche Markierung zu erkennen. Der Balken entspricht 20 µm.

starke begrenzte Markierung sichtbar; an der übrigen basolateralen Membran ist eine wesentlich schwächere und am Bürstensaum überhaupt keine Reaktion zu sehen. Mit lichtmikroskopischen Methoden läßt sich eine exaktere Lokalisierung der Fluoreszenz nicht vornehmen. Um die Frage zu beantworten, welche Zelladhäsionsstruktur des Junctional complex Uvomorulin enthält, mußte zur Elektronenmikroskopie übergegangen werden.

3.3.3. Elektronenmikroskopische Lokalisation von Uvomorulin

Der Verbindungkomplex epithelialer Zellen ist besonders deutlich am Epithel des Dünndarmes ausgebildet. Er besteht aus einer festen Anordnung dreier Zelladhäsionsstrukturen, Tight junctions (Zonula occludens), Intermediate junctions (Zonula adhaerens) und Desmosomen (Farquhar und Palade, 1963) an der dem Darmlumen zugewandten apikalen Hälfte der lateralen Zellmembran. Einen Überblick über den Verbindungskomplex im Dünndarm der Maus gibt Abb. 24 a).

Für immunelektronenmikroskopische Untersuchungen muß die

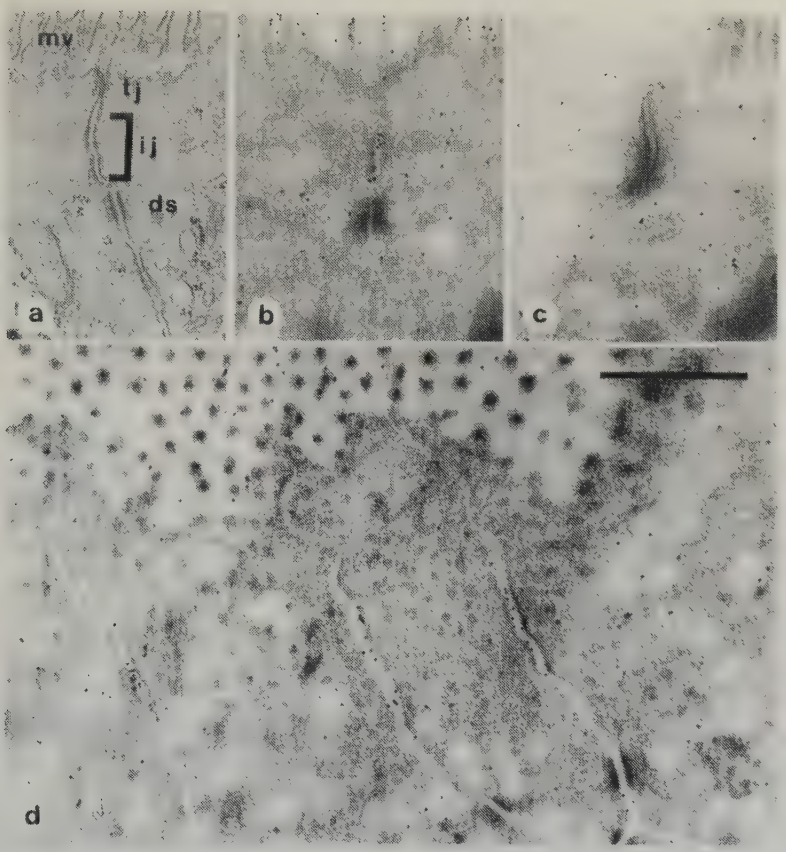

Abb. 24: Immunelektronenmikroskopische Lokalisation von Uvomorulin am Mausdünndarm. a) Zum Vergleich ein Überblick über den Verbindungskomplex, Epon eingebettetes Gewebe. b) Protein A-Gold-Markierung am Kryoschnitt, c) Kontrolle mit Kaninchen-Normalserum, d) Protein A-Gold-Markierung am Lowicrylschnitt.
mv - Mikrovilli
tj - Tight junctions
ij - Intermediate junctions
ds - Desmosomen
Der Balken in d) entspricht 1 µm.

Fixierung neben der Antigenität auch die Feinstruktur des Materials möglichst gut erhalten. Diese beiden Anforderungen stehen einander oft entgegen. Im vorliegenden Falle hatte die für die Antigenität von Uvomorulin optimale Fixierung von 2% Formaldehyd die Ultrastruktur nicht genügend erhalten, die

für Strukturuntersuchungen übliche Fixierung mit 2,5% Glutaraldehyd dagegen zerstört die Antigenität von UM. Es wurde zum Fixieren von Geweben für die Immunelektronenmikroskopie daher durchweg ein Gemisch aus 2% Formaldehyd und 0,2% Glutaraldehyd verwendet; in der Immunfluoreszenz hatte sich dieses Fixativ als - wenn auch schwächer als reine Formaldehydfixierung - geeignet gezeigt für die Darstellung von UM.

Zwei verschiedene Techniken wurden benutzt, um UM im Dünndarm der adulten Maus zu lokalisieren. Es wurden einmal ultradünne Kryoschnitte von fixiertem Material angefertigt, zum anderen wurde das fixierte Gewebe mit Äthanol entwässert, in Lowicryl, ein hydrophiles Methacrylat-Kunstharz, eingebettet und polymerisiert, um Ultradünnschnitte zu bekommen. Die Schnitte wurden jeweils für die Protein A-Gold-Markierung verwendet.

Mit beiden Markierungsverfahren wurde das gleiche Ergebnis erhalten: Uvomorulin tritt im Verbindungskomplex der Darmepithelzellen auf und dort in den Intermediate junctions, der Zonula adhaerens (Abb. 24 b und d). Tight junctions sind ebenso wie Desmosomen frei von jeglicher Markierung. An vielen Stellen läßt sich gut erkennen, daß die Markierung zwischen den benachbarten Zellen ist. Inwiefern Uvomorulin membrangebunden oder extrazellulär vorliegt, läßt sich anhand der Markierung nicht entscheiden. Auffallend aber ist, daß in Gefrierschnitten, die mit 12 nm großem Gold markiert wurden, zumeist der Abstand von beiden Zellmembranen gleich groß ist.

Das gleiche Bild ergab sich nach Immunmarkierung am Rattendünndarm (Abb. 25). Sowohl an Kryoschnitten als auch an Lowicrylschnitten war die Markierung eindeutig in den Intermediate junctions zu finden, wenn auch in deutlich geringerem Ausmaß als bei der Maus.

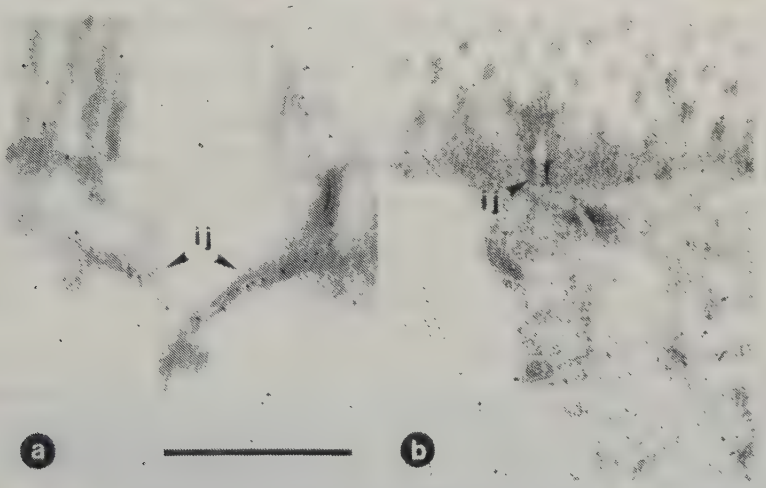

Abb. 25: Immunmarkierung von Uvomorulin am Rattendünndarm. Nur die Intermediate junctions werden markiert. a) Markierung am Kryoschnitt, 12 nm Gold, b) Markierung an Lowicryl-eingebettetem Gewebe 5-7nm Gold.
ij - Intermediate junctions
Der Balken entspricht 1 µm.

An Kryoschnitten vom Mausdünndarm war eine starke Reaktion an der apikalen, Mikrovilli-besetzten Zellmembran zu beobachten. Es handelt sich dabei um die oben erwähnte unspezifische Reaktion; sie findet sich auch bei manchen Präimmunseren. Markierung an den Mikrovilli trat nicht auf an K4M-eingebettetem Gewebe, das ja mit Äthanol entwässert wurde; Alkohol-Fixierung ließ auch die Reaktion an den Mikrovilli in der Immunfluoreszenz verschwinden. Außerdem findet man am Rattendünndarm keine Markierung der apikalen Zelloberfläche,

obwohl UM in den Intermediate junctions eindeutig nachweisbar ist. Diese Untersuchungen zeigen, daß die Reaktion des anti-UM-Antiserums an den Mikrovilli unspezifisch ist.

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz wurden so interpretiert, daß UM außer im Verbindungskomplex auch auf der basolateralen Membran vorhanden ist, wenn auch in weit geringerer Menge. Im Gegensatz dazu zeigten K4M-Schnitte keine entsprechende Markierung (Abb. 26). Möglicherweise reicht die Sensitivität dieser Methode, bei der ja nur antigene Strukturen an der Oberfläche eines Schnittes erkannt werden, nicht aus, die geringen UM-Mengen eindeutig zu identifizieren.

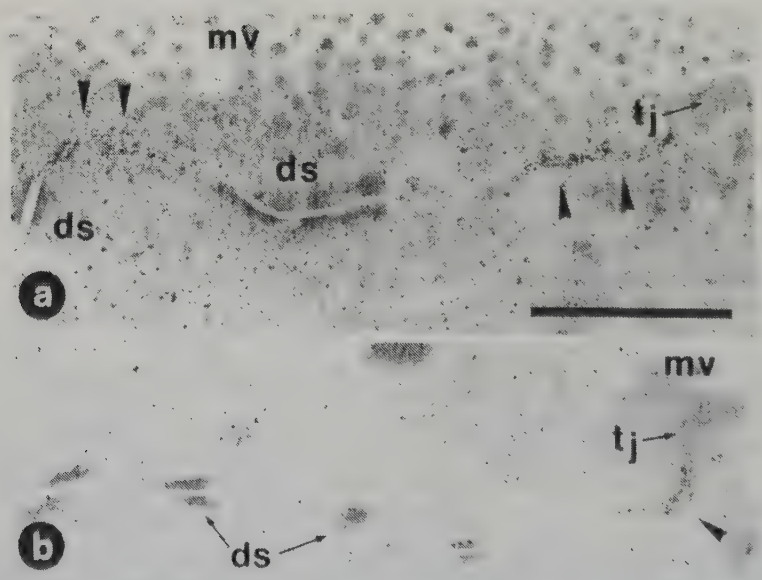

Abb. 26: Immunmarkierung von Uvomorulin am Mausdünndarm. Nur die Intermediate junctions werden markiert. a) Markierung am Kryoschnitt, 12 nm Gold, b) Markierung an Lowicryl-eingebettetem Gewebe 5-7 nm Gold.
ij - Intermediate junctions
Der Balken entspricht 1 µm.

Auch an Kryoschnitten war eine eindeutig positive Reaktion an der basolateralen Zellmembran nicht auszumachen. Nur gelegentlich konnten Stellen gefunden werden, die auf eine spezifische Reaktion schließen ließen. An der basalen Zellmembran der Epithelzelle sah es dabei oft so aus, als wäre die gesamte Basallamina markiert. Da eine solche Reaktion - wenn auch in viel geringerem Umfang - auch mit Präimmunserum auftrat , ist die Signifikanz der Markierung an der Basallamina schwer zu beurteilen. In allen Fällen war jedoch die Reaktion des Antiserums in den Intermediate juctions scharf abgegrenzt und deutlich stärker als in allen anderen basolateralen Stellen der Zellmembran. Uvomorulin kommt also - wenn auch nicht auschließlich - so doch deutlich angereichert im Bereich der Zonula adhaerens im Verbindungskomplex der Epithelzellen vor.

4. DISKUSSION

Das Verstehen der komplexen Abläufe bei der Entwicklung höherer Organismen erfordert zunächst ein Verständnis der mehr elementaren Vorgänge auf molekular- und zellbiologischer Ebene. Nach Edelman (1983) sind solche Primärprozesse der Entwicklung Zell-Teilung, Wanderung, Zellerkennung und -adhäsion, Differenzierung und programmierter Zelltod. Es ist daher sinnvoll, diese Primärprozesse an anderen, besser handhabbaren Systemen zu untersuchen, um die gewonnenen Erkenntnisse dann auf Entwicklungsvorgänge zu übertragen. In dieser Arbeit wurden einige dieser Primärprozesse untersucht:

- Es wurden einige geeignete Marker (Antikörper gegen Proteine des Zytoskeletts und der extrazellulären Matrix) für den Maus-Embryo im Eizylinderstadium beschrieben, und mit deren Hilfe wurde die Differenzierung von F9-Zellen in parietales und viscerales Entoderm verfolgt.
- Ein bisher unbeobachtetes Verhalten von Intermediärfilament-Proteinen nach Mikroinjektion von Antikörpern wurde beschrieben: Ein Protein des Zytokeratin-Netzwerkes - definiert durch einen Antikörper (TROMA 3) - zeigte eine Abspaltung von den übrigen untersuchten Zytokeratin-Proteinen, wenn der Antikörper in die Zelle mikroinjiziert wurde.
- Schließlich wurde das Zelladhäsionsmolekül Uvomorulin als Bestandteil der Zonula adhaerens im Verbindungskomplex adulter Gewebe identifiziert.

4.1. Intermediärfilamente

Intermediärfilamente sind neben den Mikrofilamenten (Aktinfilamente) und den Mikrotubuli ein Hauptbestandteil des Zytoskeletts der Zelle. Sie gelten als "mechanische Integratoren des zellulären Raumes" (Lazarides, 1980). Sie gehören zu den stabilsten Bestandteilen der Zelle überhaupt, über ihre Funktion ist im einzelnen wenig bekannt. Fünf verschiedene Filamenttypen kommen in den verschiedenen Geweben vor: Vimentinfilamente in Zellen mesenchymalen Ursprungs, Desminfilamente in Muskelzellen, Neurofilamente und Gliafilamente in Neuronen und Gliazellen und schließlich Zytokeratinfilamente in sämtlichen Epithelien. Während die vier anderen Filamenttypen aus maximal 3 verschiedenen Proteinen bestehen, sind inzwischen etwa 20 verschiedene Zytokeratine bekannt, die allerdings nicht alle in jeder Epithelzelle vorkommen. Die Zytokeratinfilamente verschiedener Gewebe unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung. Diese Eigenschaft macht sie geeignet zur Identifizierung von Geweben und Tumoren (Osborn und Weber, 1983), und wird auch in dieser Arbeit zur Charakterisierung embryonaler Gewebe benutzt.

Eine Unterscheidung von parietalem und visceralem Entoderm (PE und VE resp.) im Maus-Embryo ist von einiger Bedeutung für die Differenzierung von EC-Zellen und für die Charakterisierung von etablierten Zellinien. Zwar können PE- und VE-Zellen anhand ihrer Morphologie und biochemischer Unterschiede unterschieden werden (Dziadek und Adamson, 1978; Hogan und Tilly, 1981), an einem eindeutigen Marker für die Zellkultur hat es aber bisher gefehlt. Lehtonen et al. (1983)

fanden kürzlich, daß sich PE und VE in ihrer Expression von Intermediärfilamenten unterscheiden: Parietales Entoderm exprimiert Vimentin, viscerales dagegen nicht, während beide Zytokeratinfilamente enthalten. Aber auch Vimentin ist nicht geeignet, Zellkulturzellen eindeutig zu charakterisieren, da die meisten Zellen in Kultur unabhängig von ihrer Herkunft und unabhängig von anderen Intermediärfilamentklassen Vimentin exprimieren. Der Unterschied zwischen TROMA 1 und 3 in der Markierung von PE und VE mag hier weitaus hilfreicher sein.

Strickland und Mahdavi (1978) und Hogan et al. (1981) beschrieben die Differenzierung von F9-Zellen in Entoderm aufgrund morphologischer und biochemischer Kriterien. In dieser Arbeit wurde eine genauere Analyse mit monoklonalen Antikörpern versucht. Die Ergebnisse von Hogan konnten dabei nicht uneingeschränkt bestätigt werden. Nach Hogan differenzieren F9-Zellen zunächst in primäres Entoderm, aus dem dann - abhängig von Zell-Zellkontakten - parietales oder viscerales Entoderm entsteht. Die äußere Schicht von F9-Aggregaten wäre danach VE, Monolayer-Zellen PE. In der Immunfluoreszenz mit monoklonalen Antikörpern wurde hier allerdings beobachtet, daß die äußere Schicht von Aggregaten, ob attachiert oder in Suspension, Laminin produziert, was dagegen spricht, daß es sich bei diesen Zellen um VE handelt. Ebensowenig im Einklang damit steht die Tatsache, daß nur ein relativ geringer Prozentsatz der Aggregate eine Schicht TROMA 1-positiver Zellen besitzt, eine Voraussetzung für Zellen des visceralen Entoderms. Die am Schalenboden attachierten Zellen differenzieren zunächst in eine

heterogene Zellpopulation, binden aber zu einem hohen Prozentsatz nach 4 Tagen sämtliche untersuchten Antikörper, was für eine Differenzierung in PE entsprechend den Befunden von Hogan et al. spricht. Möglicherweise ist die Differenzierung von RA-induzierten Zellen doch komplizierter als bisher angenommen wurde.

Trotzdem scheinen F9-Zellen ein brauchbares Modell für die Differenzierung des frühen Maus-Embryos zu sein. Läßt man diesen in-vitro, in einer Kulturschale attachiert, wachsen, so zeigt er eine ähnliche Verteilung der Marker wie differenzierende F9-Zellen, auch wenn sie von der des Embryos in-vivo abweicht.

Die Untersuchung der funktionellen Bedeutung der Intermediärfilamente wurde lange Zeit dadurch erschwert, daß es keine Möglichkeit gab, diese stabilen Strukturen in-vivo anzugreifen, ohne dabei auch andere zelluläre Bestandteile zu beeinflussen. Seit der Beobachtung, daß mikroinjizierte Antikörper gegen Intermediärfilamente diese zur Disaggregation bringen, wurden genauere Untersuchungen möglich (Klymkowsky, 1981; Lin und Feramisco, 1981).

Zumindest für Zellkulturzellen sind Intermediärfilamente keine essentiellen Bestandteile, kollabiert das Intermediärfilament-Netzwerk nach Mikroinjektion, so ist der Zelle keine Veränderung anzumerken, sie behält ihre Form (Lin und Feramisco, 1981; Klymkowsky et al., 1983). Gawlitta et al. (1981) konnten sogar zeigen, daß sich solche Zellen sogar normal fortbewegen und teilen können. Die Ergebnisse dieser

Arbeit stehen damit im Einklang. Auch das Auftreten eines Zytokeratin-Netzwerkes nach Mikroinjektion von m-RNA in Zellkulturen, die normalerweise keine Zytokeratin-Filamente enthalten, beeinflußt die Zelle in keiner Weise (Kreis et al., 1983). Über die Bedeutung einer Struktur in der Embryonalentwicklung zu spekulieren, deren Funktion auf zellulärer Ebene noch derart unklar ist, wäre gegenwärtig noch verfrüht.

Intermediärfilamente sind wahrscheinlich mit vielen anderen Zellorganellen verknüpft (Blose, 1979). So kollabieren etwa Vimentinfilamente nach Zerstörung des Zytokeratin-Zytoskeletts, und es gibt einen Antikörper gegen Tubulin, der das Intermediärfilament-Netzwerk zerstört, ohne die Mikrotubuli anzugreifen (Blose et al., 1984). Über regulatorische und stabilisierende Faktoren der Intermediärfilamente ist bisher aber nichts bekannt.

Bei allen bisherigen Untersuchungen der Intermediärfilamente reagierten die Filamente als Ganzes: In der Mitose oder nach Mikroinjektion wurde entweder Reaggregation am Zellkern oder periphere Aggregation in Form von Speckles gefunden; immer aber waren sämtliche Proteine der entsprechenden Intermediärfilamente in diesen Aggregaten enthalten. Nirgends wurde bisher die hier gemachte Beobachtung beschrieben, daß sich verschiedene Proteine (das TROMA 1- und TROMA 3-Antigen) des gleichen Netzwerkes nach Mikroinjektion unterschiedlich anordnen. Darüberhinaus zeigt das TROMA 3-Antigen ein unterschiedliches Verhalten in Abhängigkeit davon, welcher Antikörper mikroinjiziert wurde. Über die Bedeutung eines

solchen Verhaltens läßt sich nur spekulieren. Möglicherweise handelt es sich beim TROMA 3-Antigen eher um ein Intermediärfilament-assoziiertes Protein, das sich nicht in jeder Beziehung wie ein eigentliches Zytokeratin verhält. Es könnte auf irgendeine Art und Weise an der Stabilisierung oder Regulation des Zytoskelett-Netzwerkes beteiligt oder für eine Assoziation mit anderen Zellorganellen verantwortlich sein. Für letzteres könnte die beobachtete Assoziation der peripheren TROMA 3-Aggregate mit Mikrotubuli ein erstes Indiz sein.

Es wurde vermutet, daß die Aggregation der Intermediärfilamente am Kern nach Mikroinjektion von Antikörpern durch direkte Vernetzung von Intermediärfilament-Proteinen zustande kommt (Gawlitta et al., 1981). Die hier mit TROMA 3 gewonnenen Ergebnisse sprechen eindeutig dagegen. Die Zytokeratin- und Vimentin-Filamente kollabieren zu einem Ring um den Kern, während der injizierte Antikörper in Aggregaten an der Zellperipherie vorliegt. Die Aggregation am Kern kann also nicht durch direkte Vernetzung entstanden sein, sie scheint vielmehr einer "natürlichen" Anordnung der Intermediärfilamente auf ein bestimmtes Signal hin zu entsprechen, wie sie auch etwa in der Mitose (Aubin et al., 1980) eingenommen wird. Auch das deutet darauf hin, daß das TROMA 3-Antigen möglicherweise an einer Stabilisierung oder Regulierung des Zytoskeletts beteiligt ist.

4.2. Uvomorulin

Eine Reihe von Molekülen, die an Zellerkennung und Zelladhäsion beteiligt sind, ist bereits bekannt (eine Übersicht findet man bei Damsky et al., 1984). Mindestens vier davon sind bei der Maus an der Kompaktion des Präimplantationsembryos beteiligt. Neben Uvomorulin sind dies das nicht näher charakterisierte Target-Molekül eines Antiserums, das die Kompaktion verhindert (Johnson et al., 1979), ein Glykoprotein "Cadherin" vom Molekulargewicht 124 000 (Shirayoshi et al., 1983) sowie ein Glykoprotein vom Molekulargewicht 120 000 (Damsky et al., 1983). Es konnte inzwischen gezeigt werden, daß mindestens zwei dieser Moleküle (Uvomorulin und Cadherin) identisch sind (Yoshida-Noro et al., 1984). Für keines von ihnen ist der genaue Mechanismus seiner Wirkung bekannt. Denkbar wären a) eine Signalfunktion, etwa über Hormonwirkung, b) eine Funktion in der Zellerkennung, die - über andere Strukturen - zu einer Adhäsion führt, c) eine direkte Beteiligung an der Verbindung mit einer Nachbarzelle. Die hier gewonnenen Ergebnisse scheinen für Uvomorulin am ehesten für die letzte Möglichkeit zu sprechen.

UM kommt in signifikanten Mengen im Darmepithel nur in jenen zellulären Strukturen vor, deren Aufgabe die eigentliche Zelladhäsion ist. Kein anderes Molekül wurde bisher extrazellulär in den Intermediate junctions gefunden. Gleichzeitig ist es bisher das einzige Molekül, das in einem funktionellen Test Zelladhäsionsfunktion hat und auch in einer Zelladhäsionsstruktur lokalisiert ist.

Während die Funktion von Tight junctions darin besteht, das Epithel als Zellschicht in vertikaler Richtung für Moleküle unpassierbar zu machen und die Desmosomen als nietenförmige Zellverbindungen passiven Zug auf ihre Nachbarzellen übertragen, ist die Zonula adhaerens diejenige Region, in der die Zelle auf ihre Nachbarzellen aktive Bewegungen überträgt und wo Zellen daher besonders fest miteinander verbunden sein müssen (Staehelin, 1974). Intrazellulär sind dort die Aktin-Mikrofilamente befestigt, die auf Höhe der Zonula adhaerens ein dreidimensionales Geflecht, den "Terminal web" bilden. Die Beteiligung des Terminal web an morphogenetischen Ereignissen ist bewiesen (Karfunkel, 1974). Die Tatsache, daß UM am ersten morphogenetischen Vorgang der Embryonalentwicklung, nämlich der Kompaktion, beteiligt ist, legt nahe, daß auch hier ein Mechanismus wirksam ist, bei dem Aktinfilamente über Zellkontaktstellen auf Nachbarzellen Bewegung übertragen. Die Folge davon wäre, daß sich die Zellen gegeneinander abflachen. Die Rolle von Uvomorulin könnte dabei die einer Art von "Kitt" sein, der die Gegenkraft gegen den Zug der Mikrofilamente bildet.

EC-Zellen und präkompakte Stadien des Maus-Embryos (Hyafil et al., 1983) tragen UM auch auf der freien Oberfläche. Im Verlaufe der Differenzierung verschwindet es dort und ist an ausdifferenzierten Zellen nur noch an den Stellen des Zell-Zell-Kontaktes zu finden. An MDCK-Zellen und zum Teil auch an differenzierten F9-Zellen kann Uvomorulin nur nach einer Permeabilisierung der Zellen mit Detergenz oder Methanol nachgewiesen werden. Offenbar verhindern Tight junctions die Zugänglichkeit der Intermediate junctions für Antikörper. Im

Verlauf der Differenzierung muß es also zu einer Umverteilung des Moleküls auf der Zelloberfläche kommen.

Sheffield und Moscona isolierten 1970 Nervenzellen aus Hühner-Embryonen und verfolgten ihre Reaggregation in-vitro. Dabei beobachteten sie das frühe Auftreten von Adhaerens junctions in den sich bildenden Aggregaten. Kürzlich führten Lehtonen et al. (1984) ein ähnliches Experiment durch: Sie aggregierten undifferenzierte F9-Zellen mit Maus-Embryonen und schauten im Elektronenmikroskop nach der Art der sich bildenden Zellkontakte. Neben Gap und Tight junctions bildeten sich in Kürze Kontakte vom Intermediate junctions-Typ aus. Es sprechen also einige Fakten dafür, daß bei Differenzierungs- und morphogenetischen Vorgängen häufig Adhaerens junctions beteiligt sind. Es bleibt abzuwarten, ob Uvomorulin bei all diesen Vorgängen beteiligt ist und ob es noch andere Moleküle dieser Funktion gibt.

Ziomek und Johnson (1981) isolierten die inneren und äußeren Zellen des Maus-Embryos im 16-Zell-Stadium und studierten deren Eigenschaften. Sie fanden eine unterschiedliche Adhäsivität: Innere Zellen sind relativ adhäsiv, die äußeren dagegen nicht. Ähnliches gilt als Unterschied zwischen undifferenzierten und differenzierten Teratokarzinomzellen. Undifferenzierte sind stark adhäsiv und aggregieren schnell, in Kultur wachsen sie deshalb als regelrechte Zellhaufen. Differenzierte Zellen dagegen wachsen zumeist als einschichtige Monolayer, sie sind weniger adhäsiv. Diese Unterschiede im Aggregationsverhalten sind der Grund für das schon lange bekannte Phänomen des "sorting out", bei dem sich

Zellen unterschiedlicher Adhäsivität voneinander trennen, wenn man sie gemischt wachsen läßt (Townsend und Holtfreter, 1955). Dabei bilden sich in Mischkulturen von EC-Zellen und differenzierten Zellen Aggregate, in denen die undifferenzierten im Zentrum , die differenzierten Zellen an der Peripherie wachsen. Die beobachtete unterschiedliche Verteilung von Uvomorulin an EC- und differenzierten Zellen könnte zu einem solchen Unterschied in der Adhäsivität der Zellen beitragen.

In diesem Zusammenhang mag interessant sein, daß auch einer der zahlreichen Unterschiede zwischen normalen Zellen und Krebszellen in ihrer unterschiedlich starken Adhäsivität besteht. Die Fähigkeit, Metastasen zu bilden, hängt damit zusammen. Und mindestens ein Produkt eines Onkogens, das src-Genprodukt, ist intrazellulär in den Intermediate junctions lokalisiert. Das Aufklären der molekularen Struktur dieser Zellkontakte verspricht daher wichtige Erkenntnisse nicht nur für die Entwicklungsbiologie, sondern auch für das Verständnis des Krebsgeschehens. Zwar beginnt man den intrazellulären Aufbau der Adhärens junctions langsam zu verstehen (Geiger, 1983), nichts aber weiß man bisher über molekulare Strukturen zwischen den Zellen. Die Lokalisation von Uvomorulin in den Intermediate junctions des Dünndarm-Epithels liefert dazu einen Ansatz.

Biochemische Experimente lassen vermuten, daß UM kein integrales Membranprotein ist (Peyriéras et al., 1983; Vestweber und Kemler, 1984). Aus Protein A-Gold-Markierungen läßt sich nur schwer eine entsprechende Aussage ableiten,

eine Lokalisation auf wenige Nanometer genau müßte auch die Schnittdicke und Schnittebene mit in Betracht ziehen. In den Präparationen ist allerdings die stärkste Markierung immer zwischen den benachbarten Zellen. Bei einem integralen Membranprotein, das über seine ganze Länge antigene Determinanten trägt, die vom Antiserum erkannt werden, sollte man eine Markierung ebenso weit in die Zelle hineinreichend finden, wie von der Zelle weg. Das mag ein Hinweis darauf sein, daß der Hauptbestandteil des UM-Moleküls sich tatsächlich auf der Außenseite der Zelle befindet.

Gemeinhin werden als Zellkontakte vom Adhärens junction-Typ solche Zellverbindungen bezeichnet, in denen intrazellulär Aktinfilamente über α-Actinin und Vinculin mit der Membran verbunden sind. Neben den Intermediate junctions sind das die Glanzstreifen im Herzmuskel und die fokalen Kontakte, mit denen Gewebekulturzellen sich an der Unterlage festheften. Die Tatsache, daß UM in Zellkulturen nicht zwischen Zelle und Schalenboden zu finden ist, spricht gegen die Annahme eines gemeinsamen Aufbaues dieser Zelladhäsionsstrukturen, zumindest im extrazellulären Bereich.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Antikörper sind aus zwei Gründen für entwicklungsbiologische Untersuchungen von ganz besonderem Vorteil: Zum einen sind sie als Marker verwendbar, die mit Strukturen bestimmter Entwicklungsstadien oder mit bestimmten embryonalen Geweben spezifisch reagieren. Dadurch wird es möglich, die Zelltypen des Embryos in-vivo leichter zu unterscheiden und die Differenzierung von Teratokarzinomzellen bequem in-vitro zu verfolgen. Zum anderen ist es möglich, mit Antikörpern in das Entwicklungsgeschehen einzugreifen, etwa einen bestimmten Schritt zu blockieren und so Antigene zu charakterisieren, die in der Embryonalentwicklung eine wesentliche Rolle spielen. Diese beiden Möglichkeiten, Antikörper zu nutzen, verwendet die vorliegende Arbeit, um Primärprozesse der Entwicklung, wie Zellerkennung, Zelladhäsion oder Zelldifferenzierung zu studieren.

TROMA 1 und TROMA 3, zwei monoklonale Antikörper gegen Proteine des Zytoskeletts, wurden als Marker für den Maus-Embryo im Eizylinderstadium beschrieben. Sie sind geeignet zur Unterscheidung von visceralem und parietalem Entoderm. Zusammen mit zwei weiteren Antikörpern ist eine eindeutige Identifizierung sämtlicher Gewebe des 6 Tage alten Maus-Embryos möglich. Mit diesen Markern wurde die Differenzierung von F9-Zellen untersucht.

Mikroinjektionsexperimente von TROMA 1 und 3, zwei anti-Intermediärfilament-Antikörpern, zeigten für die beiden

entsprechenden Antigene ein unterschiedliches Verhalten. Nach Mikroinjektion von TROMA 3 wurde eine "Auftrennung" der Zytokeratin-Proteine beobachtet. Während das TROMA 3-Antigen in Aggregaten an der Zellperipherie vorlag, waren alle anderen untersuchten Intermediärfilamentproteine nur um den Kern herum angeordnet. Eine solche Aufspaltung von Intermediärfilamentproteinen wurde bisher noch nirgends beobachtet.

Das Zelladhäsionsmolekül Uvomorulin, das an der Kompaktion des frühen Maus-Embryos beteiligt ist, konnte durch elektronenmikroskopische Immunmarkierungen als Bestandteil der Intermediate junctions im Epithel des Dünndarms identifiziert werden. Es ist das erste Molekül, das extrazellulär in dieser Zelladhäsionsstruktur gefunden wurde. Gleichzeitig ist es das erste funktionelle Zelladhäsionsmolekül, das auch in einer Zellkontaktstruktur lokalisiert werden konnte.

6. ABKÜRZUNGEN

EC-Zellen	Embryonale-Karzinom-Zellen
EM	Elektronenmikroskop
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
ICM	Innere Zellmasse
PAG	Protein A-Gold
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PE	Parietales Entoderm
PEG	Polyethylenglykol
RA	Retinolsäure (retinoic acid)
UM	Uvomorulin
VE	Viscerales Entoderm

7. LITERATURVERZEICHNIS

Armbruster, B.L., Carlemalm, E., Chiovetti, R., Gravito, R.M., Hobot, J.A., Kellenberger, E. und Villiger, W. (1982). Specimen preparation for electron microscopy using low temperature embedding resins. J. Microsc. 126, 77-85.

Armbruster, B.L., Gravito, R.M. und Kellenberger, E. (1983). Dehydration and embedding temperatures affect the antigenic specifity of tubulin and immunolabeling by the protein A-colloidal gold technique. J. Histochem. Cytochem. 31, 1380-1384.

Artzt, K., Dubois, P., Bennett, D., Condamine, H., Babinet, C. und Jacob, F. (1973). Surface antigens common to mouse cleavage embryos and primitive teratocarcinoma cells in culture. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 2988-2992.

Aubin, J., Osborn, M., Franke, W.W. und Weber, K. (1980). Intermediate filaments of the vimentin type and the cytokeratin-type are distributed differently during mitosis. Exp. cell res. 129, 149-165.

Bernstine, E.G., Hopper, M.L., Grandchamp, S. und Ephrussi, B. (1973). Alkaline phosphatase activity in mouse teratomas. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 3899-3903.

Beug, H., Gerisch, G., Krempff, S., Riedel, V. und Cremer, G. (1970). Specific inhibition of cell contact formation in Dictyostelium by univalent antibodies. Exp. cell res. 63, 147-158.

Blose, S.H., (1979). Ten-nanometer filaments and mitosis: Maintenance of structural continuity in dividing endothelial cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 3372-3376.

Blose, S.H., Meltzer, D.I. und Feramisco, J.R. (1984). 10 nm filaments are induced to collapse in living cells microinjected with monoclonal antibodies against tubulin. J. Cell Biol. 98, 847-858.

Brinster, R.L. (1974). The effect of cells transferred into the mouse blastocyst on subsequent development. J. Exp. Med. 140, 1049-1056.

Brûlet, P., Babinet, C., Kemler, R. und Jacob, F. (1980). Monoclonal antibodies against trophectoderm specific markers during mouse blastocyst formation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4113-4117.

Buc-Caron, M.H., Condamine, H. und Jacob. F. (1978). The presence of F9 antigen on the surface of mouse embryonic cells until day 8 of embryogenesis. J. Embryol. exp. Morphol. 47, 149-160.

Buc-Caron, M.H. und Dupouey, P. (1980). On the nature of the F9 antigenic determinants. Mol. Immunol. 17, 655-662.

Carlemalm, E., Gravito, R.M. und Villiger, W. (1982). Resin development for electron microscopy and an analysis of embedding at low temperature. J. Microsc. 126, 123-143.

Damjanov, I. und Solter, D. (1974). Experimental teratoma. Curr. Top. Pathol. 59, 69-134.

Damsky, C.H., Richa, J., Solter, D., Knudsen, K. und Buck, C.A. (1983). Identification and purification of a cell surface glycoprotein mediating intercellular adhesion in embryonic and adult tissue. Cell 34, 455-466.

Damsky, C.H., Knudsen, K. und Buck, C.A. (1984). Integral membrane glycoproteins in cell-cell and cell-substrate adhesion. In: The biology of glycoproteins, Ivatt, R.J. Hrsg., Plenum Press, New York und London.

Diacumakos, E.G. (1973). Methods of micromanipulation of human somatic cells in culture. Methods Cell Biol. 7, 287-311.

Doetschman, T.C., Eistetter, H., Katz, M., Schmidt, W. und Kemler, R. (eingereicht). The in-vitro development of a blasocyst-derived embryonic stem cell line: Formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. J. Embryol. exp. Morphol.

Ducibella, T., Albertini, D.F., Anderson, E. und Biggers, J.D. (1975). The preimplantation mammalian embryo: Characterization of intercellular junctions and their appearance during development. Develop. Biol. 45, 231-250.

Dziadek, M. und Adamson, E. (1978). Localization of alphafetoprotein in postimplantation mouse embryos. J. Embryol. exp. Morphol. 43, 289-313.

Edelman, G.M. (1983). Cell adhesion molecules. Science 219, 450-457.

Edidin, M., Patthey, H.L., McGuire, E.J. und Sheffield, W.D. (1971). In: Embryonic and Fetal Antigens in Cancer, S. 239-248, Anderson, N.G. und Coggins Jr., J.H., Hrsg., Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, Tennessee.

Evans, M.J. und Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature 292, 154-156.

Farquhar, M.G. und Palade, G.E. (1963). Junctional complexes of various epithelia. J. Cell Biol.17, 376-411.

Faulk, W.P., und Taylor, G.M. (1971). An immunocolloid method for the electron microscope. Immunocytochemistry 8, 1081-1083.

Franke, W.W., Grund, C., Kuhn, C., Jackson, B.W. und Illmensee, K. (1982a). Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis. III. Primary mesenchymal cells and the first appearence of vimentin filaments. Differentiation 23, 43-59.

Franke, W.W., Schmid, E., Grund, C. und Geiger, B. (1982b). Intermediate filament proteins in nonfilamentous structures: Transient disintegration and inclusion of subunit proteins in granular aggregates. Cell 30, 103-113.

Gawlitta, W., Osborn, M. und Weber, K. (1981). Coiling of intermediate filaments by microinjection of a vimentin-specific antibody does not interfere with locomotion and mitosis. Eur. J. Cell Biol. 26, 83-90.

Geiger, B. (1983). Membrane-cytoskeleton interactions. Biochim. Biophys. Acta 737, 305-341.

Goodfellow, P.N., Levinson, J.R., Williams II, V.E. und McDewitt, H.O. (1979). Monoclonal antibodies reacting with murine teratocarcinoma cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 377-380.

Griffiths, G., Brands, R., Burke, B., Louvard, D. und Warren, G. (1982). Membrane proteins acquire galactose in Golgi cisternae during intracellular transport. J. Cell Biol. 95, 781-792.

Henderson, D. und Weber, K. (1981). Immunoelectron microscopical identification of the two types of intermediate filaments in established epithelial cells. Exp. Cell Res.132, 297-311.

Hogan, B.L.M. und Tilly, R. (1981). Cell interactions and endoderm differentiation in cultivated mouse embryos. J. Embryol. exp. Morphol. 62, 379-394.

Hogan, B.L.M., Taylor, A. und Adamson, E. (1981). Cell interactions modulate embryonal carcinoma cell differentiation into parietal or visceral endoderm. Nature 291, 235-237.

Hamburger-Shevinsky, L., Knowles, B.B., Damjanov, I. und Solter, D. (1982). Monoclonal antibody to murine embryos defines a stage-specific embryonic antigen expressed on mouse embryos and human teratocarcinoma cells. Cell 30, 697-705.

Hyafil, F., Morello, D., Babinet, C. und Jacob, F. (1980). A cell surface glycoprotein involved in the compaction of embryonal carcinoma cells and cleavage stage embryos. Cell 21, 927-939.

Hyafil, F., Babinet, C. und Jacob, F. (1981). Cell-cell interactions in early embryogenesis: A molecular approach to the role of calcium. Cell 26, 447-454.

Hyafil,F., Babinet, C., Huet, C. und Jacob, F. (1983). Uvomorulin and compaction. In: Teratocarcinoma stem cells, S. 197-207, Silver, L.M., Martin, G.R. und Strickland, S. Hrsg. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Jackson, B.W., Grund. C., Schmid, E., Bürki, K., Franke, W.W. und Illmensee, K. (1980). Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis. I. Intermediate filaments of the cytokeratin type and desmosomes in preimplantation embryos. Differentiation 17, 161-179.

Jackson, B.W., Grund, C., Winter, S., Franke, W.W. und Illmensee, K. (1981). Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis. II. Epithelial differentiation and intermediate sized-filaments in early postimplantation embryos. Differentiation 20, 203-206.

Jacob, F. (1977). Mouse teratocarcinoma and embryonic antigens. Immun. Rev. 33, 3-32.

Jacob, F. (1979). Cell surface and early stages of mouse embryogenesis. Curr. top. in develop. biol. 13, 117-13.

Johnson, M.H. (1981). The molecular and cellular basis of preimplantation mouse development. Biol. Rev. 56, 463-493.

Johnson, M.H., Chakrabarty, J., Handyside, A.H., Willison, K. und Stern, P. (1979). The effect of prolonged decompaction on the development of the preimplantation mouse embryo. J. Embryol. Exp. Morphol. 54, 241-261.

Karfunkel, P. (1974). The mechanisms of neural tube formation. Int. Rev. Cytol. 38, 245-271.

Kemler, R., (1981). Analysis of mouse embryonic cell differentiation. Fortschritte der Zoologie 26, 175-181.

Kemler, R., Babinet, C., Condamine, H., Gachelin, G., Guenet, J.L. und Jacob, F. (1976). Embryonal carcinoma antigen and the T/t locus of the mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 4080-4084.

Kemler, R., Babinet, C., Eisen, H. und Jacob, F. (1977). Surface antigen in early differentiation. Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 4449-4452.

Kemler, R., Morello, D. und Jacob, F. (1979). Properties of some monoclonal antibodies raised against mouse embryonal carcinoma cells. In: Cell lineage, stem cells and cell determination, S. 101-113, Hrsg. Le Douarin, N. Biomedical Press, Elsevier/North-Holland.

Kemler, R., Brûlet, P., Schnebelen, M. Gaillard, J. und Jacob, F. (1981a). Reactivity of monoclonal antibodies against intermediate filament proteins during embryonic development. J Embryol. exp. Morphol. 64, 45-60.

Kemler, R., Brûlet, P. und Jacob, F. (1981b). Monoclonal antibodies as a tool for the study of embryonic development. In: The Immune System, I., Bd. 1 S. 102-109, Hrsg. Steinberg, C.M. und Lefkovits, Verlag S. Karger, Basel.

Kirby, D.R.S. (1968). The immunological consequences of extrauterine development of allogenic mouse blastocysts. Transplantation 6, 1005-1009.

Klymkowsky, M. (1981). Intermediate filaments in 3T3 cells collapse after intracellular injection of a monoclonal anti-intermediate filament antibody. Nature 291, 249-251.

Klymkowsky, M.W., Miller, R. und Lane, E.B. (1983). Morphology, behavior, and interactions of epithelial cells after the antibody-induced disruption of keratin filament organization. J. Cell Biol. 96, 494-509.

Köhler, G. und Milstein, C. (1975). Continous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256, 495-497.

Kreis, T.E. und Birchmeier, W. (1982). Microinjection of fluorescently labeled proteins into living cells with emphasis on cytoskeletal proteins. Int. Rev. Cytol. 75, 209-227.

Kreis, T.E., Geiger, B., Schmid, E., Jorcano, J.L. und Franke, W.W. (1983). De novo synthesis and specific assembly of keratin filaments in nonepithelial cells after microinjection of m-RNA for epidermal keratin. Cell 32, 1125-1137.

Lane, E.B. (1982). Monoclonal antibodies provide specific intramolecular markers for the study of epithelial tonofilament organization. J.Cell Biol. 92, 665-673.

Lane, E.B., Goodman, S.L., und Trejdosiewicz, L.K. (1982). Disruption of the keratin filament network during epithelial cell division. EMBO J. 1, 1365-1372.

Lazarides, E. (1980). Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. Nature 283, 249-256.

Lehtonen, E., Wartiovaara, J. und Reima, I. (1984). Cell relationships during aggregation between preimplantation embryos and teratocarcinoma cells. J. Embryol. exp. Morphol. 81, 17-35.

Leunissen, J.L.M., und Van Bergen en Henegouwen, P. (1984). Contolled growth of colloidal gold particles. Ultramicroscopy (im Druck).

Lin, J.C. und Feramisco, J.R. (1981). Disruption of the in vitro distribution of intermediate filaments in fibroblasts through the microinjection of a specific monoclonal antibody. Cell 24, 185-193.

Luft, J.H. (1961). Improvements in epoxy resin embedding methods. J. Biophys. Biochem. Cytol. 9, 409-413.

Martin, G.R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 7634-7638.

Matsui, S., Yoshida, H., Weinfeld, H. und Sandberg, A.A. (1972). Induction of prophase in interphase nuclei by fusion with metaphase cells. J. Cell Biool. 54, 120-132.

Millonig, G. (1961). A modified procedure for lead staining of thin sections. J. Biophysic. Biochem. Cytol. 11, 736-739.

Mintz, B., und Illmensee, K. (1975). Normally genetic mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3585-3589.

Moeremans, M. und de Mey, J. (1984). Preparaton of 8-9 nm colloidal gold particles using a modified citrate reduction method. Their application for post embedding electron microscopic immuno-gold staining. J. Histochem. Cytochem. (im Druck).

Oakley, B.R., Kirsch, D.R. und Morris, N.R. (1980). A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamid gels. Annal. Biochem. 105, 361-367.

Osborn, M. und Weber, K. (1982). Intermediate filaments: Cell-type-specific markers in differentiation and pathology. Cell 31, 303-306.

de Petris, S. und Raff, M.C. (1973). Normal distribution, patching and capping of Lymphocyte surface immunoglobulin studied by electron microscopy. Nature New Biol. 241, 257-259.

Peyriéras, N., Hyafil, F., Louvard, D., Ploegh, H.L. und Jacob, F. (1983). Uvomorulin: A nonintegral membrane protein of early mouse embryo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 6274-6277.

Pratt, H.P.M., Ziomek, C.A., Reeve, W.J.D., and Johnson, M.H. (1982). Compaction of the mouse embryo: An analysis of its components. J. Embryol. Exp. Morphol. 70, 113-132.

Pierce, G.B. und Beals, T.F. (1964). Cancer Res. 24, 1553-1558.

Romano, E.L. und Romano, M. (1977). Staphylococcal protein A bound to colloidal gold: A useful reagent to label antigen-antibody sites in electron microscopy. Immunocytochemistry 14, 711-715.

Roth, J. (1982). The protein A gold-technique. Qualitative and quantitative approach for antigen localization in thin

sections. In: Techniques in Immunocytochemistry, Vol. I, S. 104-137 Bullock, G. R. und Petrusz, P. Hrsg., Academic press, London.

Sheffield, J.B. und Moscona, A.A. (1970). Electron microscopic analysis of aggregation of embryonic cells: The structure of aggregates of neural retina cells. Develop. Biol. 23, 36-61.

Shirayoshi, Y., Okada, T.S. und Takeichi, M. (1983). The calcium dependent cell-cell adhesion system regulates inner cell mass formation and cell surface polarization in early mouse development. Cell 35, 631-638.

Solter, D. und Knowles, B.B. (1978). Monoclonal antibody defining a stage specific mouse antigen (SSEA-1). Proc. natl. Acad. Sci. USA 75, 5565-5569.

Staehelin, L.A. (1974). Structure and function of intercellular junctions. Int. rev. Cytol. 39, 191-283.

Stern, P.L., Willison, K.R., Lennox, E., Galfré, G., Milstein, C., Ziegler, A. und Springer, T. (1978). Monoclonal antibodies as probes for differentiation and tumor-associated antigens: A Forssman specificity on teratocarcinoma stem cells. Cell 14, 775-783.

Stevens, L.C., (1967). Origin of testicular teratocarcinomas from primordial germ cells in mice. J. Natl. Cancer Inst. 38, 549-552.

Stevens, L.C. (1970). The development of transplantable teratocarcinomas from intratesticular grafts of pre- and postimplantation embryos. Dev. Biol. 21, 364-382.

Stevens, L.C. und Little, C.C. (1954). Spontaneous testicular teratomas in an inbred strain of mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 40, 1080-1087.

Stevens, L.C. und Varnum, D.S. (1974). The development of teratomas from parthenogenetically activated ovarian mouse eggs. Dev. Biol. 37, 340-369.

Strickland, S. und Mahdavi, V. (1978). The induction of differentiation in teratocarcinoma stem cells by retinoic acid. Cell 15, 393-403.

Tarkowsky, A.K. und Wroblewska, J. (1967). Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell

stage. J. Embryol. exp. Morphol. 18, 155-180.

Todaro, G.J. und Green, H. (1963). Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in cultures and their development into established cell lines. J. Cell Biol. 17, 299-313.

Tokuyasu, K.T. (1973). A technique for ultracryotomy of cell suspensions and tissues. J. Cell Biol. 57, 551-565.

Tokuyasu, K.T. (1978). A study of positive staining of ultrathin sections. J. Ultrastruct. Res. 63, 287-307.

Tokuyasu, K.T. und Okamura, S. (1969). A new method for making glass knives for ultrathin sectioning. J. Biophys. Biochem. Cytol. 6, 305-309.

Tokuyasu, K.T. und Singer, S.J. (1976). Improved procedures for immunoferritin labeling of ultrathin frozen sections. J. Cell Biol. 71, 894-906.

Townsend, P. und Holtfreter, J. (1955). Directed movements and selective adhesion of embryonic amphibian cells. J. exp. Zool. 128, 53-120.

Vestweber, D. und Kemler, R. (1984). A rabbit antiserum against a purified surface glycoprotein decompacts mouse preimplantation embryos and reacts with specific adult tissues. Exp. Cell Res. 152, 169-178.

Yoshida-Noro, C., Suzuki, N. und Takeichi, M. (1984). Molecular Nature of the calcium-dependent cell-cell adhesion system in mouse teratocarcinoma and embryonic cells studied with a monoclonal antibody. Develop. Biol. 101, 19-27.

Ziomek, C.A. und Johnson, M.H. (1981). Properties of polar and apolar cells from the 16 cell mouse morula. Roux's Archives of Develop. Biol. 190, 287-296.

Lebenslauf

Name:	Klaus Boller
Geburtsdatum und -ort:	7. 10. 1954, Darmstadt
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schulbildung, Wehrpflicht

1961-73	Schulbesuch in Darmstadt
1973	Abitur am humanistischen Ludwigs-Georgs-Gymnasium in Darmstadt
Okt. 1973 - Juni 1975	Wehrdienst beim Heeresmusikkorps 9 der Bundeswehr in Stuttgart/Bad Cannstatt

Studium

1975-1977	Studium der Biologie (Diplom) an der TH Darmstadt
1977	Diplomvorprüfung
1977-1981	Studium der Biologie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
1980/81	Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Virusforschung und am Friedrich-Miescher-Laboratorium der Max-Planck-Gesellschaft in Tübingen unter Anleitung von Herrn Dr. H. Frank und Herrn Prof. R. Kurth über das Thema: "Elektronenmikroskopische Untersuchung Oncovirus-artiger Partikel aus menschlichen Teratokarzinom-Zellkulturen"
Nov. 1981 - Nov. 1984	Arbeit am Friedrich-Miescher-Labor der Max-Planck-Gesellschaft in Tübingen unter der Leitung von Herrn Dr. R. Kemler an der vorliegenden Dissertation

Meine akademischen Lehrer waren:

In Darmstadt:
Cuny, Kluge, Läuchli, Lieser, Lüttge, Luh, Magnus, Martin, Menzel, Waidelich

In Tübingen:
Braun, Frank, Guglielmi, Kemler, Kurth, Lorenz, Möhres, Pfeiffer, Sander, Seyffert, Zähner, Zarybnicky